

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Peter C. Weber

**Die Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 bei der
Apoptoseregulation glatter Gefäßmuskelzellen der
Neointima**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ariane J. Rode
aus Hannover
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Wolfgang Erl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2009

Meinen Eltern, meiner Oma und Stefan in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung und Stand der Forschung	6
1.1 Blutgefäßsystem: Angiogenese - Vaskulogenese	6
1.2 Atherosklerose	8
1.3 Neointimale Hyperplasie - Restenose	10
1.4 Progenitorzellen	11
1.5 Apoptoseregulation und Signalwege	12
1.6 Tumorsuppressorprotein p53	17
1.7 Apoptoseinduktion und p53-Modulation	21
1.8 Vaskuläre Prothesen - Patches	24
2. Fragestellung	26
3. Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel	27
3.1.2 Verwendete Software	28
3.1.3 Testsubstanzen	28
3.1.4 Reagenzien und Antikörper	29
3.1.5 Sonstige Chemikalien	30
3.1.6 Puffer und Lösungen	31
3.1.7 Zellen	33
3.2 Methoden	35
3.2.1 Zellkultur	35
3.2.1.1 Isolation von Zellen	35
3.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellkulturen	35
3.2.1.3 Beurteilung / Pflege der Zellen	36
3.2.1.4 Lebendzellzahlbestimmung /Trypanblauausschlusstest	36

3.2.1.5	Passage	36
3.2.1.6	Mycoplasmentest	36
3.2.2	Versuchsbedingungen	37
3.2.2.1	MTT - Test - Proliferationsassay (E-screen)	37
3.2.2.2	Durchflusszytometrische Untersuchung	38
3.2.2.3	Extraktion von Gesamtprotein – Proteinbestimmung	42
3.2.2.4	Western Blot	43
3.2.2.5	siRNA	44
3.2.2.6	Transfektion und Transduktion	45
3.2.2.7	Migrationsassay und Proliferation	47
3.2.2.8	Statistische Auswertung	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Untersuchung der rSMC – MTT-Assay und FACS	49
4.2	Untersuchung der hSMC – MTT-Assay und FACS	56
4.3	Western Blot	63
4.3.1	Vorversuche in L87-Zellen	63
4.3.2	Expression und Regulation von p53 in SMC	67
4.4	siRNA in hSMC der Neointima	70
4.4.1	Transfektion von siRNA in hSMC der Neointima – Magnetofektion	70
4.4.2	Tranduktion von siRNA in hSMC der Neointima – Effizienzanalyse	71
4.4.3	Immunologischer Nachweis des p53-Knockdowns	73
4.5	Effekte von Formaldehyd und Glutaraldehyd auf SMC: Proliferation und Migration	74

5. Diskussion	79
5.1 Vergleichende Untersuchung von SMC der Media und Neointima	79
5.2 Einfluss von Statinen auf die Proliferation und Apoptose in SMC	81
5.3 Einfluss von PRIMA-1 und PFTα auf die Apoptose	85
5.4 Einfluss von Doxorubicin auf die Apoptose	86
5.5 Expression von p53 und <i>knockdown</i>	86
5.6 Unterschiedliche Patchmaterialien und Restenose	89
5.7 Statin-beschichtete Stents zur Restenoseprävention	90
6. Zusammenfassung	93
7. Literaturverzeichnis	94
8. Anhang	106
9. Publikationen und Kongressbeiträge	108
10. Danksagung	110
11. Lebenslauf	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	Glu	Glutamat
Ann-V ⁺ / PI ⁻	Annexin-V positive / PI negative	Gly	Glycin
AS	Aminosäure(n)	GMM	Glycerin-Marker-Mix
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>	GTC	Guanidinthiocyanat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	h	Stunde(n)
b	Base(n)	HBS-Puffer	phosphatreicher Puffer (hanks-buffered-saline)
bp	Basenpaar(e)	HDL	<i>high-density-lipoproteins</i>
Caspasen	Cysteinyl Aspartat-spezifische Proteasen	hSMC	<i>human smooth muscle cells</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>	hUA	<i>human umbilical artery</i>
CEA	<i>carotid endarterectomy</i>	IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	kb	Kilo-Basenpaare
Cys	Cystein	l	Liter
Da	Dalton	LDL	<i>low-density-Lipoprotein</i>
dd.	bidestilliert	m	milli (10 ⁻³)
DES	<i>drug eluting stent</i>	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
dest.	destilliert	Mdm-2	<i>murine double minute gen2</i>
DHA	Dokosahexaensäure	min	Minute(n)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	MMP	Matrix-Metallo-Protease
DMSO	Dimethylsulfoxid	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)	MTT	Methylthiazoletetrazolium
DNase	Desoxyribonuclease	NAD	Nicotinamadeninindinucleotid
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'- triphosphat	NADPH	Nicotinamadeninindinucleotid- hydrogenphosphat
Dox	Doxorubicin	OD	optische Dichte
ECGM	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>	P/S	Penicillin/Streptomycin-Lösung
EtBr	Ethidiumbromid	PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
EtOH	Ethanol	PBS (-/-)	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
FACSscan	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>	PBS (+/+)	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymeraskettenreaktion
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	PFTα	Pifithrin α
FS	Fettsäure	PI	Propidiumiodid
fwd	<i>forward</i>	PS	Phosphatidylserin
g	Erdbeschleunigungskonstante		
G/A	Gentamycin/Amphotericin		
G-418	Genitacin		
GFP	<i>green fluorescent protein</i>		

PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i>
Ras	kleines G-Protein
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rSMC	<i>rat smooth muscle cells</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> PCR
s	Sekunde(n)
SAE	<i>serious adverse event</i> , schwerwiegende Nebenwirkung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMC	<i>smooth muscle cells</i> / glatte Gefäßmuskelzellen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl- Transferase
T _m	DNA-Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end</i> <i>labeling</i>
UV	ultraviolettes Licht (100 bis 400 nm)
V	Volt
VIS	sichtbares Licht (400 bis 700 nm)
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen

1. Einleitung und Stand der Forschung

1.1 Blutgefäßsystem: Angiogenese - Vaskulogenese

Das Blutgefäßsystem ist das erste ausgebildete Organ im Embryo. Es ist für die weitere Entwicklung essentiell und dient dem Transport von Nährstoffen und Endprodukten des Stoffwechsels (Plendl, 2000). Das Blutgefäßsystem entsteht aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm. Zwei histologisch unterschiedliche Mechanismen sind für die Bildung von Blutgefäßen verantwortlich: zum einen die *de novo* Synthese aus sich *in situ* differenzierenden Angioblasten (Vaskulogenese), zum anderen die Aussprossung von neuen Blutgefäßen aus bereits vorhandenen (Angiogenese) (Carmeliet, 2000; Risau, 1997).

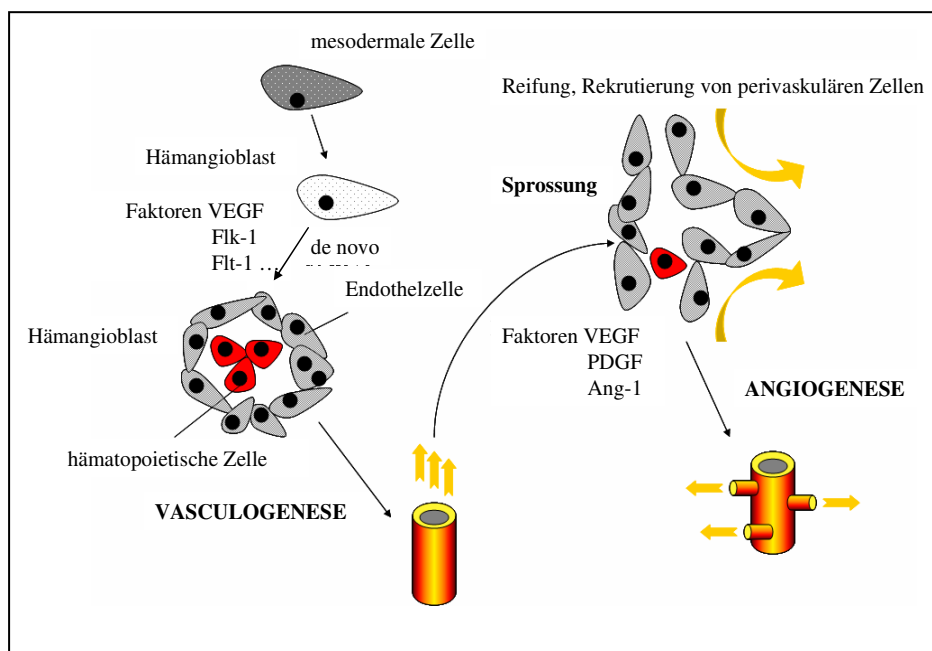


Abb. 1: Schematische Darstellung der Angiogenese und Vaskulogenese (Grafik A. Rode)

Beide Mechanismen existieren nebeneinander und gleichzeitig (Risau, 1997). Die Angiogenese wird durch zahlreiche Faktoren wie z.B. Zelladhäsionsmoleküle, Komponenten der extrazellulären Matrix, Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren beeinflusst (Abb. 1). Durch Differenzierung und Wachstum entwickelt sich ein komplexes vaskuläres System aus Kapillaren und Venolen (Pool und Coffin, 1989). Im Verlauf der Angiogenese kommt es zum Abbau der extrazellulären Matrix bereits bestehender Endothelzellen, zur Migration und Proliferation der Endothelzellen und zur Bildung von Kapillaren (Carmeliet und Collen, 1998). Die Angiogenese erfolgt sowohl bei physiologischen Prozessen wie dem embryonalen Wachstum, der Wundheilung und dem Zyklus der Frau als auch bei pathologischen Prozessen wie der Tumorbildung, der Atherosklerose, chronischen Entzündungen (rheumatische Arthritis, Crohnsche Krankheit), Diabetes mellitus (Retinopathie), Endometriose und Adipositas (Griffioen und Molema, 2000). Die Vaskulogenese ist nicht nur auf die

Embryogenese beschränkt, was durch den Nachweis von endothelialen Progenitorzellen in peripherem Blut von Erwachsenen erwiesen ist (Risau, 1997).

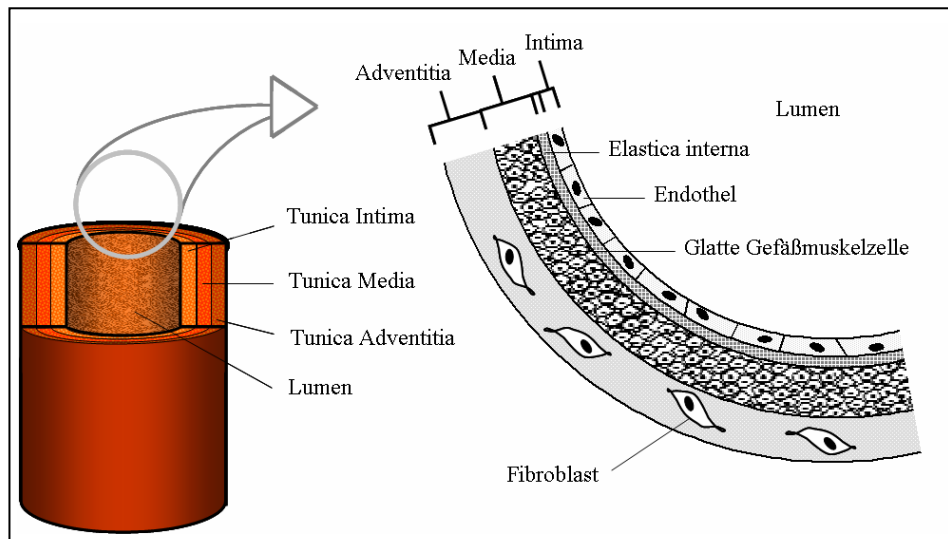


Abb. 2: Schematischer Aufbau einer Arterie (Grafik A. Rode)

Histologisch unterteilt man eine Arterie in drei Schichten (Abb. 2), die Tunica intima, die Tunica media und die Tunica adventitia. Die Intima besteht aus einer Endothelzellschicht zum Blutfluss hin und feinen Fasernetzen, der Elastica interna als Abgrenzung zur Media. Die mittlere, dickste Schicht, die Media, besteht aus glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) sowie konzentrischen elastischen Faserplatten und -netzen, wohingegen die äußerste Gefäßschicht, die Adventitia, aus Bindegewebe besteht, welches das Blutgefäß in seiner Umgebung verankert.

1.2 Atherosklerose

Als häufigste Todesursache in Deutschland sowie anderen westlichen Industrienationen gelten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Lusis, 2000). Mit einem Anteil von durchschnittlich 44 % stirbt etwa jeder 2. Bundesbürger heute an den Folgen einer Herz-Kreislauferkrankung (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007). Die pathologische Ursache von Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt meist die Atherosklerose dar.

WHO-Definition:

Atherosklerose ist eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blut, Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe und Calciumablagerungen, begleitet von Veränderungen in der Media.

Atherosklerose (von griechisch: *Athare* = Grütze, *Atheroma* = Grützbeutel, *Sklero* = hart) ist eine generalisierte Erkrankung der Gefäßwand, bei der Läsionen als Resultat komplexer Interaktionen von Blutbestandteilen (vor allem Leukozyten) und Cholesterin mit der Gefäßwand, den Endothelzellen und den SMC vorliegen, welche eine endotheliale Dysfunktion, eine sinkende Elastizität, einen verringerten Durchmesser und damit eine Blutgefäßverengung zur Folge haben. Veränderungen in der Tunica Intima in der Arterie und Lipid-, Kalk- und Bindegewebeinlagerungen verursachen dabei die Verdickung der Gefäßwand, welche besonders die Aorta, die Koronar- und die Gehirnarterien betrifft (Ross, 1999; Lusis, 2000).

Die Atherogenese verläuft nach Definition der *American Heart Association* nach histomorphologischen Kriterien in 6 Stadien (Abb. 3) und kann bereits im frühen Kindesalter beginnen. Entzündungsreaktionen der Gefäßwand verursachen eine endotheliale Dysfunktion. Die Stimulation der SMC durch Wachstumsfaktoren und eine Fibrosierung resultiert in einer Verdickung der Zellschicht und somit einer Lumeneinengung. Leukozyten adhärieren durch Chemokine und Entzündungszellen infiltrieren. Monozyten migrieren zum Entzündungsort und werden durch Chemokine und die Einlagerung von LDL zu Makrophagen ausdifferenziert, welche lipidbeladen als Schaumzellen bezeichnet werden. Weitere Lipoproteine werden eingelagert, eine reversible Gefäßwandverdickung findet statt und es entstehen sogenannte Fettstreifen (*fatty streaks*) durch die Akkumulation der Schaumzellen in der Intima (Lusis, 2000). Erste Symptome sind beim Patienten zu beobachten. Fibrinöse Plaques sind entstanden. Durch die Einlagerung von Kalksalzen wird die atherosklerotische Läsion komplex und nicht mehr reversibel. Eine fortschreitende Stenosierung des betroffenen Gefäßsegments hat eine verminderte Flussrate zur Folge, was wiederum die Entstehung ischämischer Myokardbezirke in Situationen erhöhten O₂-Bedarfs verursacht (Enos et al., 1953).

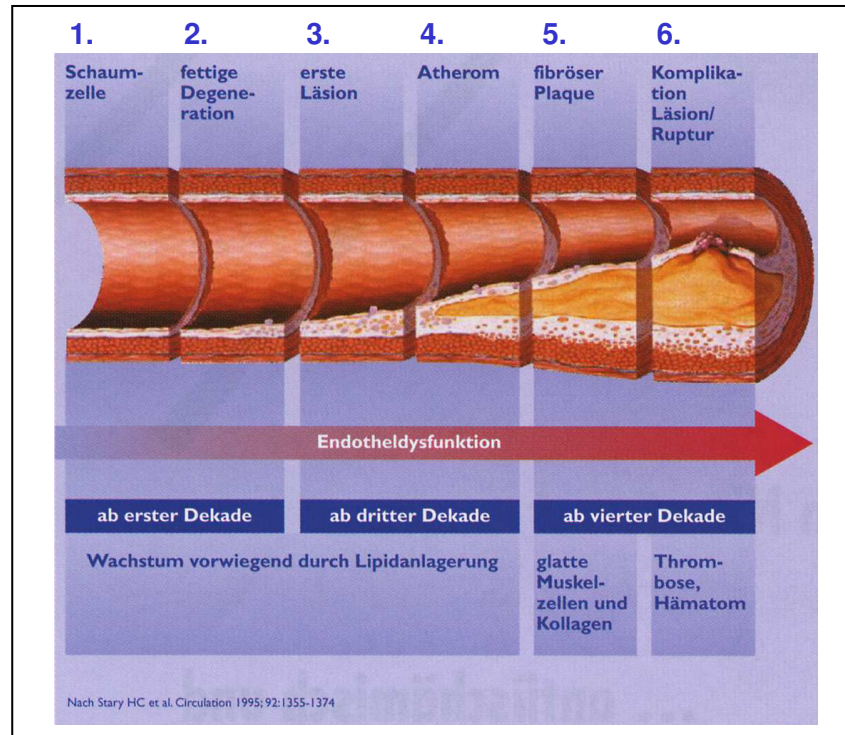


Abb. 3: Schematischer Ablauf der Atherosklerose (mod. nach Stary HC et al. Circulation 1995; 92: 1355 – 1374)

Eine atherosklerotische Plaque ist entstanden. Wenn dieser Prozess weiter fortschreitet, entsteht eine pathologische Verdickung der Gefäßwand. Unter Umständen kann eine atherosklerotische Plaque aufbrechen (Plaqueruptur, atherosklerotischer Ulkus), wodurch Plättchen und das Immunsystem aktiviert werden. Die dadurch bedingte Exposition extravaskulärer Matrix sowie des prothrombotischen Lipidmaterials führt zur Bildung eines Thrombus. Dieser kann einen subtotalen oder totalen thrombotischen Verschluss des betroffenen Gefäßes und damit eine akute Ischämie des distal liegenden Gewebes (Schlaganfall, Myokardinfarkt) verursachen.

Epidemiologische Studien konnten in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von Risikofaktoren für die Atheroskleroseentstehung identifizieren (Lusis, 2000). Die multifaktorielle Krankheit verursacht erst nach einem Zeitraum von vielen Jahren Symptome, die klinisch nachgewiesen werden können. Die Ursachen können in unveränderliche Faktoren wie Alter, Geschlecht, familiäre Disposition (genetische Faktoren) als auch variable Faktoren wie Lebensstil, Nicotinabusus, Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Fettstoffwechselstörungen unterschieden werden (Risikofaktoren 1. Ordnung). Risikofaktoren 2. Ordnung wie zum Beispiel Bewegungsmangel, Adipositas können ebenfalls zu den Ursachen zählen. Folgeerkrankungen wie Angina pectoris, Herzinfarkt, Aneurismen, Schlaganfall (Infarkt), arterieller Bluthochdruck, Nierenversagen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) können auftreten. Diagnosen werden durch Angiogramme, Augenhintergrundmessungen (Phthalmoskopie), die Doppler Sonographie (Ultraschall-

Doppler-Methode) und Bestimmung des LDL/HDL-Cholesterin-Spiegels gestellt. Hämodynamisch erkennbar ist auch eine erhöhte systolische Maximalgeschwindigkeit. Therapeutisch kann eine Medikation mit Lipidsenkern wie z.B. Statinen, Aggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure (ASS), Clopidogrel oder Behandlung von Hypertonie und Diabetes mellitus erfolgen. Invasive chirurgische Maßnahmen zur Revaskularisation bestehen in Rotablation, Atherektomie, Laserangioplastie und der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA), welche auch als Ballon-Katheter und Ballon-Dilatation bekannt ist und bei der Stents zum Einsatz kommen können (Abb.4). Bei einer PTCA wirken Drücke von 100 bis 2000 kPa, um Ablagerungen zu sprengen. Im Fall einer irreversibel geschädigten Arterie kann ein Bypass eingesetzt werden, bei partieller operativer Entfernung der Arterie eine vaskuläre Prothese (sog. Patch).



Abb.4: Stentdesign (1)

1.3 Neointimale Hyperplasie - Restenose

Die SMC-Migration von der Media in die Intima und eine anschließende Proliferation unter Einfluss von Wachstumsfaktoren (PDGF, *platelet derived growth factor*) und Zytokinen führt zur Ausbildung der Neointima („scar tissue“) und der sogenannten Hyperplasie. Vaskuläre Progenitorzellen, die im Blutstrom zirkulieren und sich an das verletzte Gefäßareal anlagern, sind ebenfalls an der Entstehung der Neointima beteiligt (Hillebrands et al., 2003; Sata et al., 2005). Durch eine PTCA wird eine Gefäßverletzung verursacht, welche eine initiale lokale

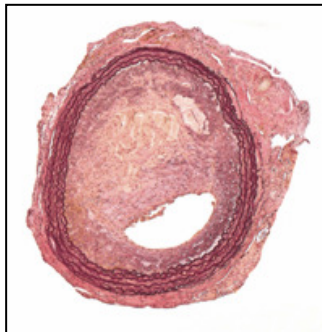


Abb. 5: Neointima-Bildung (2)

Entzündungsreaktion hervorruft (Bauriedel und Höfling, 1995), welche auch als „*response to injury*“-Hypothese bezeichnet wird (Lüscher et al., 1996). Die Ballon-Dilatation erzeugt Komplikationen im Sinne eines Risses zwischen undehnbaren Plaqueschichten und dehnbaren äußeren Gefäßarealen (Pasterkamp et al., 2000). Nach PTCA mit Überdehnung der Koronargefäße kann durch elastische Rückstellkräfte der Gefäßwand (*elastic or early recoil*) wieder ein Lumenverlust erfolgen. Durch die Verletzung der Arterie

und die Exposition subendothelialer Matrixproteine und Kollagenfasern gegenüber dem Blutstrom entsteht ein Thrombus (Komatsu et al., 1998). Der einsetzende Heilungsprozess der Arterie schießt bei verzögerter Reendothelialisierung über sein Ziel hinaus und kann zu einer progressiven neointimalen Hyperplasie führen, welche auch als Restenose bezeichnet wird, das heißt, ein nahezu vollständiger Verschluss des Blutgefäßes kann erfolgen (Nobuyoshi et al, 1988) (Abb. 5). Als relevante Restenose gilt der Verlust von mehr als 50% des erlangten Lumengewinns nach PTCA (Lowe et al., 2002; Holmes et al., 1984).

(1) Stentdesign (http://www.med266483&lang=en_US)tronic.com/Details.do?itemId=1110142266483&lang=en_US)

(2) Neointima-Bildung (<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/uploads/pics/histo.gif>)

Nach erfolgreicher PTCA kommt es bei bis zu 35% aller Patienten zu einer symptomatischen Restenose, bei zusätzlichem Einsatz eines Stents bei 19% aller Fälle (Mercado et al., 2001). Man unterscheidet zwischen Restenose nach PTCA und In-Stent-Restenose (ISR). Beide weisen sowohl hinsichtlich der Genese als auch Morphologie diverse Unterschiede zu primären atherosklerotischen Läsionen auf. Im Falle der atherosklerotischen Läsion spielt die Angiogenese bei Plaqueexpansion und Restenose eine Rolle, wo sie durch die Gefäßneubildung für Wachstum und Entwicklung sorgt und die Erhaltung und Expansion der Neointima gewährleistet (Moulton, 2001). Therapeutische Maßnahmen zur Prävention der Restenose sind die Brachytherapie, bei der eine radioaktive Quelle im Blutgefäß wirkt, die Implantation eines Medikamenten-freisetzenden Stents (*drug eluting stent*, DES), mit partieller Wirkung eingesetzte Antithrombotika (Antikoagulation, Antiaggregation), antiproliferative Substanzen wie Zytostatika, vasoaktive Substanzen wie ACE-Hemmer, lipidsenkende Pharmaka und antioxidative Substanzen sowie der neueste Einsatz der Genterapie (Bhargava et al., 2003). Angiographisch kontrollierte Plaque-Regressionsstudien zeigen, dass die medikamentöse Cholesterinsenkung zwar zu einer deutlichen Reduktion kardiovaskulärer Komplikationen führt, aber kaum den angiographisch nachweisbaren Stenosegrad beeinflusst (Müller-Wieland et al., 1999).

1.4 Progenitorzellen

Diese als pluripotent geltenden Vorläuferzellen (Progenitor) sind maßgeblich an der Blutgefäßentstehung beteiligt. Sie fördern das Gefäßwachstum durch parakrine Mechanismen, verbessern die Neovaskularisation, nehmen Teil an der Neointimabildung und sind resistent gegen oxidativen Stress (Tongrong et al., 2004). Sie haben eine hohe Regenerationsfähigkeit, und der festgelegte Funktionsbereich ist noch reversibel, weshalb sie manchmal als determinierte Stammzellen bezeichnet werden. Sie kommen in Gewebe, Herz, Muskulatur, Fettgewebe, in Nabelschnurblut, in der Milz, im Hoden, der Haut, Gehirn, Blut und im Knochenmark vor. Nach dem momentanen Forschungsstand ist der genaue Ursprung der Zellen noch ungeklärt sowie auch die Definition der Progenitorzelle an sich unklar im Unterschied zur Stammzelle. Mögliche therapeutische Optionen für den Einsatz von Progenitorzellen sind die Reparatur von verletzten Gefäßwänden, die Neovaskularisation, die Regeneration von ischämischem Gewebe und die Beschichtung vaskulärer Transplantate. Die Anzahl dieser Zellen, ihre Mobilisierung, Differenzierung und das Homing wird durch Erkrankungen wie etwa Diabetes oder Hypercholesterinämie, aber auch Rauchen, zunehmendes Alter und manifeste Gefäßerkrankungen beeinflusst (Werner et al., 2005). Marker für Progenitorzellen sind CD34 für hämatopoietische Stammzellen, CD117 für vaskuläre Vorläufer und CD133 für endotheliale Progenitorzellen. Eine genaue Charakterisierung von Progenitorzellen ist nur durch multifaktorielle Analyse möglich.

1.5 Apoptoseregulation und Signalwege

Unter der Apoptose (griechisch *απόπτωση* - das Abfallen, der Niedergang; *apo*, *απο*: von – weg; *ptosis*, *πτωσις* : das Fallen) versteht man den Vorgang des aktiven programmierten Zelltodes, eines streng biochemisch-zytogenetisch vorbestimmten, kontrollierten Programms zur Beseitigung überflüssiger oder unerwünschter Zellen bei allen Metazoen. Die Elimination alter, geschädigter oder anderweitig potentiell schädlicher Zellen bewahrt die Gewebshomöostase und hält damit das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose aufrecht. Sie wirkt antagonistisch der Zellproliferation in der embryonalen Entwicklung (Vaux und Korsmeyer, 1999). Im Gegensatz zur Nekrose (griechisch *Nekros*, *νεκροσ* tot), welche als katastrophenartiger, passiver Zelltod mit vollständigem Zusammenbruch der intrazellulären Homöostase und Regulation beschrieben wird, wird dieser physiologische und phylogenetisch konservierte Prozess der Apoptose von der betroffenen Zelle selbst durchgeführt (Kerr et al, 1972; Cohen, 1993). Der Vorgang der Apoptose spielt eine essentielle Rolle bei der Embryogenese in Geweben und Organen der Metazoen (Raff, 1992) sowie beim Gewebsumbau durch Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelltod in Gefäßen und Organen.

Am Ablauf und Regulation der Apoptose sind eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB, AP-1 und pro- oder antiapoptotische Proteine wie z.B. Bax, Bcl-2 und Bcl-x_L beteiligt. Neben Tumorbildung und Tumorprogression sowie Virusinfektionen spielt die Apoptose auch bei der Immunabwehr, Autoimmunerkrankungen (AIDS), chronisch entzündlichen degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Vaux und Korsmeyer, 1999; Williams, 1994) und bei der Atherosklerose eine wichtige Rolle.

Verschiedene exogene und endogene Faktoren beziehungsweise Signale aus der Umgebung der Zelle können bewirken, dass diese die Apoptose einleitet, wie zum Beispiel hormonelle Einflüsse (Steroide), Hypoxie, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitzeschock, UV-Strahlung, Chemotherapeutika, Hypertonie, Reperfusion, oxidativer Stress, Rezeptoraktivierung und DNA-Schäden (Barr und Tomei, 1994). Schäden an der DNA aktivieren Stoffwechselwege, die entweder zur Reparatur der DNA oder zur Apoptose führen. Dieser Effekt ist abhängig vom Zelltyp und dem Ausmaß des Schadens (Raghupathi et al., 2000; Evan und Littlewood, 1998).

In Abbildung 6 sind schematisch zwei Wege der Apoptoseinduktion skizziert. Über ligandenaktivierte Zelloberflächenrezeptoren, die sogenannten Todesrezeptoren, kann der Signalweg der Apoptose ablaufen (Schulze-Osthoff et al., 1998). Durch Trimerisierung und Komplexierung mit Todesdomänen werden SODDs (*silencers of death domains*) verdrängt, die DISCs (*death inducing signal complexes of death domain receptors*) rekrutiert und eine Aktivierung von Signalelementen und Initiatorcaspasen ausgelöst (Ashkenazi und Dixit, 1998).

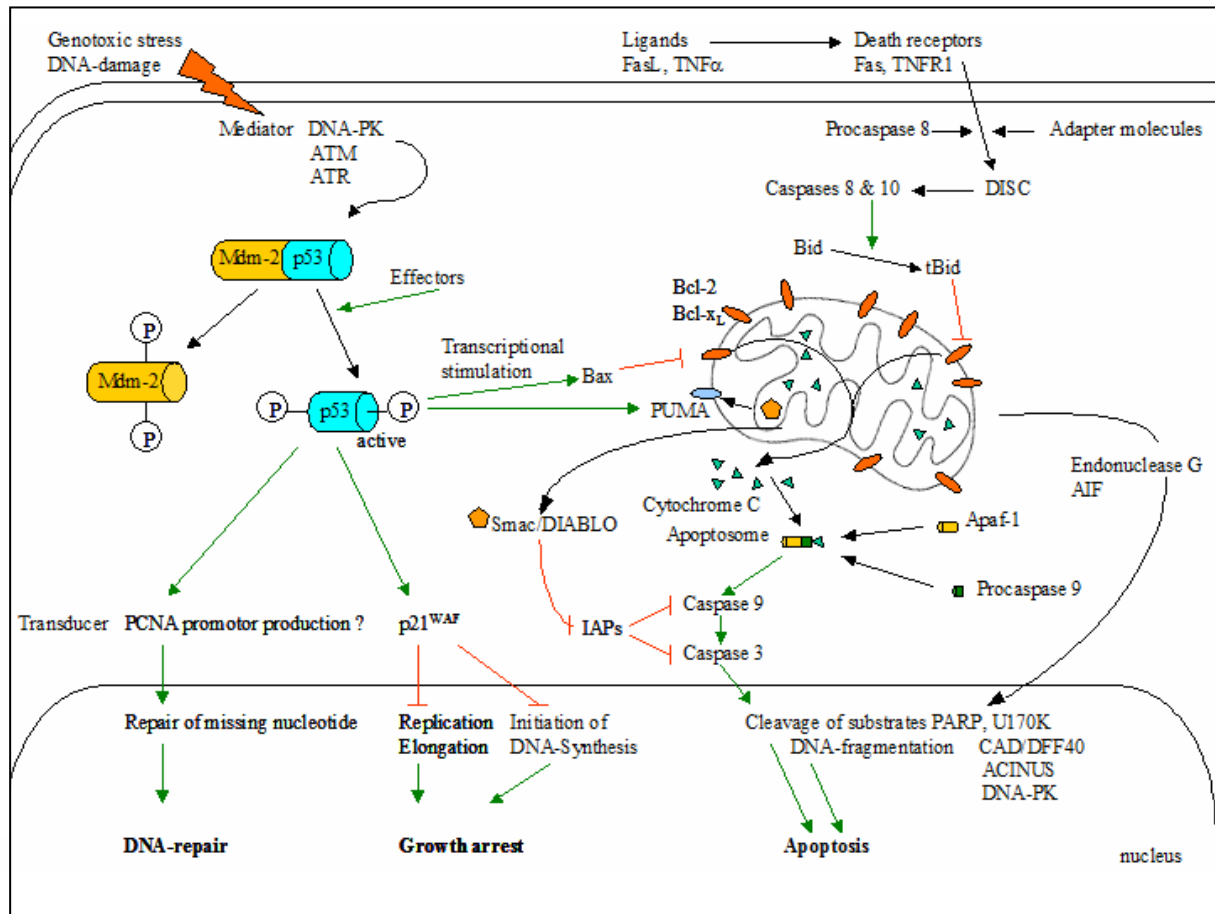


Abb. 6: Schematisch stark vereinfachter Ablauf der Apoptose (Grafik A.Rode)

Durch Aktivierung dieser Rezeptoren wird eine Kaskade über Caspasen und Adaptermoleküle ausgelöst, welche zur proteolytischen Spaltung des proapoptotischen Proteins Bid aus der Familie der Mitochondrienmembran-ständigen Bcl-2-Proteine (*B-cell lymphoma protein 2*) in tBid (*truncated Bid*) führt, welches nun entweder selber oligomerisiert oder die Oligomerisierung von Bax oder Bak, ebenfalls proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, bewirkt. Durch diese Oligomerisierung wird Cytochrom C aus dem Mitochondrium freigesetzt. Im Laufe der frühen Apoptose wird auf der Innenseite der Zellmembran eingelagertes Phosphatidylserin (PS) durch Inhibierung der Aminophospholipid-Translokase unter ATP-Verbrauch und Ca^{2+} -abhängig durch die Phospholipids scramblase auf die Membranaußenseite transloziert (Kagan et al., 2000). Der Verlust der Membranstabilität führt zur Ausstülpung (Zeiose) der Zellmembran. Außerdem erfolgt eine Peroxidation von Phosphatidylserin sowie die Spaltung des Zytoskelettproteins Fodrin, welches an der Verankerung von Phosphatidylserin an der Membranninnenseite beteiligt ist (Vanags et al., 1996; Fabisiak et al., 1997). Die Positionsänderung von Phosphatidylserin löst die Erkennung und Endocytose apoptotischer Zellen durch Phagozyten aus (Fadok et al., 1992, 1998). Der zweite Weg der Apoptoseinduktion erfolgt durch die Aktivierung und Stabilisierung des p53 durch DNA-Schädigung, was zur Folge hat, dass das proapoptotische Protein Bax

überexprimiert wird. Erhöhte Expression von Bax führt wiederum zu einer Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium.

Freigesetztes Cytochrom C oligomerisiert unter ATP-Verbrauch mit Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) und der Procaspase-9 zum so genannten Apoptosom (700kDa) (Wang, 2001; Hengartner, 1997). Die Aktivierung der Caspase-9 erfolgt durch eine Apaf-1 induzierte Konformationsänderung des Proteins (Stennicke et al., 1999), woraufhin Caspase-9 die Effektorcaspase-3 binden und proteolytisch aktivieren kann (Hu et al., 1999, Li et al., 1997). Über diese Caspase-Kaskade wird im Nukleus durch Aktivierung endogener Proteasen der Prozess der Apoptose biochemisch initiiert. Es erfolgt eine Substratspaltung, unter anderem der Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP). Nach dem Verlust der Membranstabilität, der enzymatischen DNA-Fragmentierung, der Chromatinkondensation, den sinkenden Proteinsyntheseraten und der Schrumpfung des Zellkerns erfolgt die Proteolyse des Zytoskeletts und des Zytosols (Zytoskelettdegradierung über Ubiquitin-Proteasom-System). Die Zelle schrumpft. Plasmamembranphospholipide werden lose gepackt, eine Organellenrelokalisierung findet statt und die Membran kollabiert (Ciechanover, 1994; Squier et al., 1994). Unter Aufrechterhaltung der Membranintegrität und des osmotischen Gradienten werden membranumschlossene Zellbestandteile abgeschnürt (*blebbing*) und so genannte *apoptotic bodies* entstehen. *Apoptotic bodies* werden von benachbarten Zellen und Makrophagen phagozytiert, weshalb die Apoptose unter physiologischen Bedingungen als nichtentzündlicher Prozess abläuft. Sobald jedoch das phagozytotische Potential erschöpft ist und die Apoptose weiter fortgeschritten ist, kann eine so genannte sekundäre Nekrose eintreten (Fiers et al., 1999; Majno und Joris 1995).

Caspasen

Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose. Die Caspase-Enzyme (Cystein-beinhaltende Asparat-spezifische Proteasen) werden in frühen Stufen der Apoptose aktiviert, was als Schlüsselkomponente für die apoptotische Zellmaschinerie gilt und eine Enzym-Kaskade auslöst sowie das Signal der Initiator-Caspasen amplifiziert. Die Kaskaden werden extrinsisch und intrinsisch durch Proteolyse aktiviert und dienen zum

- ➔ Abbau von Apoptoseinhibitoren (pos. Feedback)
- ➔ Abbau von Zytoskelettproteinen und Kernmembranprotein Lamin A
- ➔ Aktivieren/Inaktivieren von Enzymen aus Signal- und Regulationsprozessen.

Es gibt zwei Signalwege, die zur Aktivierung der Caspasen führen. Zum einen die bereits erwähnte Aktivierung durch sogenannte Todesrezeptoren, zum anderen den rezeptorunabhängigen Signalweg durch Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Die im Zytosol inaktiv vorliegende latente Procaspase wird durch Proteolyse

in zwei kleine und zwei große Untereinheiten gespalten, welche als Heterodimer aktiv wirken können. Die Spaltung der Procaspasen erfolgt an bestimmten Aspartaten mit hoher Substratspezifität durch aktive Caspasen, durch Autoaktivierung der Caspasen über Aggregation und teilweise durch Granzym B aus cytolytischen Lymphozyten (Salvesen 1997; Thornberry und Lazebnik 1998). Die Oligomerisierung mehrerer ungespaltener Procaspasen bewirkt die autoproteolytische Aktivierung von Initiatorcaspasen, welche als Initialschritt zur proteolytischen Aktivierung der hochaktiven Effektorcaspasen angesehen wird (Yang et al., 1998).

Bcl-2-Protein-Familie

Die Bcl-2- Protein-Familie besteht aus membranständigen Proteinen. Ihre zahlreichen Mitglieder können die Integrität der Membran regulieren und sowohl inhibitorische, anti-apoptotische als auch promotorische, proapoptotische Funktionen ausüben (siehe Tabelle 1).

Die Proteine kommen in der Kernmembran, der äußeren Mitochondrienmembran, im Zytosol sowie im ER und dessen Membran vor und werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, in hohen Mengen jedoch in reproduktivem Gewebe. Bcl-2-Proteine kontrollieren den nukleären p53-Import und die zytosolische und nukleäre Calciumhomöostase (Beham et al., 1997; Lam et al., 1994). Proteine dieser Familie haben eine *feedback loop* mit Caspasen, deren Aktivität durch eine Hemmung der Cytochrom-C-Freisetzung aus dem Mitochondrium als auch durch Bindung an APAF-1 inhibiert wird.

Sie zeichnen sich durch 4 Domänen hoher Sequenzhomologie aus (Tsujimoto und Shimizu, 2000). Diese konservierten Bereiche spielen eine große Rolle und sind Voraussetzung für Interaktion und Ausbildung von Homo- und Heterodimeren und somit gegenseitiger Beeinflussung der Proteine (Reed, 1996; 1997). Antiapoptotische Proteine können an proapoptotische Proteine binden und diese somit inaktivieren (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997).

Tab. 1: Proteine der Bcl-2-Familie, ihr Effekt auf Apoptose und mögliche Interaktionen (Oltvai et al., 1993; Yang et al., 1995)

Protein	Effekt auf Apoptose	Name
Bcl-2	↓	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
Bcl-x _L	↓	<i>B-cell lymphoma proteinxl</i>
Bid	↑	<i>BH3 interacting domain</i>
Bcl-x _S	↑	<i>B-cell lymphoma protein xs</i>
Bax	↑	<i>Bcl-2-interactive cell death susceptibility regulator</i>
Bak	↑	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bad	↑	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>

Durch Heterodimerisierung des proapoptotischen Bax mit antiapoptotischem Bcl-2 oder Bcl-xL wird seine Funktion als proapoptotisches Protein eingeschränkt und blockiert (Oltvai et al., 1993; Sedlak et al., 1995). Bax und Bcl-2 müssen als Homodimere vorliegen, um ihre Funktion erfüllen zu können, in dem Fall der Apoptose als Bax-Homodimer und im Fall des Überlebens als Bcl-2-Monomer oder -Homodimer. Folglich ist die Bcl-2/Bax-Ratio entscheidend für das Schicksal einer Zelle (Oltvai und Korsmeyer, 1994).

Eine Überexpression an Bcl-2 verhindert die Apoptose in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen (Chao und Korsmeyer, 1998). Eine erhöhte Bax-Expression und supprimierte Expression antiapoptotischer Proteine hingegen induziert Apoptose (Antonawich et al., 1998). Die Transkription des antiapoptotischen Bcl-2 wird durch das Tumorsuppressorprotein p53 vermindert und die Expression des proapoptotischen Bax induziert (Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995). Im Laufe der Apoptose wird Bcl-2 Protein durch Caspasen gespalten. Das Protein besitzt nun proapoptotische Aktivität, verursacht die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol und fördert damit weitere Caspase-Aktivität. Ebenfalls vermutlich durch die Oligomerisierung proapoptotischer Mitglieder wie tBid und Bax wird die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran verursacht, was wiederum zur Freisetzung von Cytochrom C und anderer proapoptotischer Proteine führt (Kuwana et al., 2002). Das Protein Bid, ebenfalls ein Protein der Bcl-2-Famili, besitzt keine C-terminale Transmembrandomäne zur Lokalisation an den Mitochondrien und wird im Laufe der Todesrezeptoren-vermittelten Apoptose von Caspasen zu tBid gespalten und wirkt proapoptotisch (Han et al., 1999; Antonsson und Martinou, 2000).

Poly - (ADP-Ribose) - Polymerase (PARP)

PARP sind 113 kDa große nukleäre Proteine der Gruppe Zink-bindender Enzyme, welche den Transfer von ADP-Ribose Untereinheiten von NAD^+ zum Proteinakzeptor katalysieren (Pacher und Szabó, 2007). Proportional zur Zahl der Strangbrüche in der DNA wird das latent aktive Kernenzym aktiviert und inaktiviert durch Ribosylierung nukleäre Endonucleasen, was zur DNA-Reparatur führt. Dabei verhindert die Integrität des im Modulcharakter aufgebauten PARP die Degradation der genomischen DNA. Durch die im Laufe der Apoptose initiierte, mittels Caspase-3 stattfindende Spaltung von PARP bilden sich zwei stabile Fragmente (89 kDa und 24 kDa) und die katalytische Aktivität des PARP wird aufgehoben (Kaufmann und Hengartner, 2001). Ca^{2+} - und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonucleasen werden durch die Poly-ADP-Ribose-Glykohydrolase aktiviert und die DNA-Ligase inaktiviert (Counis & Torriglia 2000, Wyllie 1998). Im bereits schrumpfenden Zellkern wird die DNA enzymatisch fragmentiert (50 bis 300 kbp) (Narula et al., 1997). Das Chromatin kondensiert, die Transkriptionsaktivität wird eingestellt und RNA- und Proteinsyntheserate sinken (Hengartner 2000).

1.6 Tumorsuppressorprotein p53

Das humane Tumorsuppressorprotein p53 besteht aus 393 Aminosäuren (murin 387 AS) bei einer Größe von 53 kDa und seine genetische Information ist auf dem Chromosom 17p3.1 lokalisiert (Lane and Crawford, 1979). Es hat antiproliferative und proapoptotische Wirkung, die durch Kombination von Genaktivierung (zum Beispiel p21WAF1 und Bax), Genunterdrückung (zum Beispiel IGF II und Bcl-2) und durch direkte Interaktionen zwischen Proteinen (zum Beispiel Helicase und Caspase) vermittelt wird (Lohrum und Vousden, 2000; Gottlieb und Oren, 1998). p53 wirkt als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung, es kontrolliert den Zellzyklus, kann Apoptose induzieren und zur DNA-Reparatur führen, weshalb es auch als „guard of the genome“ bezeichnet wird (Kern et al., 1991; Lane, 1992).

p53 wird durch die Phosphorylierung von Serinstellen in seine aktive Konformation geführt. Die Rolle des p53 beim Vorgang der Apoptose lässt sich wie folgt schematisiert darstellen: Durch eine DNA-Schädigung (Rich et al., 2000), genotoxischen und nicht genotoxischen Stress (Vogelstein et al., 2000; Vousden und Lu, 2002) werden DNA-abhängige Proteinkinasen aktiviert, deren Ziel die Phosphorylierung von p53 ist (Abb. 7). Auslöser der p53-Aktivierung können DNA-Schäden oder Schädigung von Komponenten sein, die für die Kontrolle und Verteilung des zellulären genetischen Materials notwendig sind, z.B. mitotischer Spindelapparat, Ribonucleotid-Depletion, Hitzeschock, Hypoxie, NO-Exposition oder auch durch Onkogene wie Myc, Ras, E1A (Hermeking und Eick, 1994; Serrano et al., 1997).

Der Transkriptionsfaktor p53 liegt im Normalzustand gebunden mit dem Onkoprotein Mdm2 (*murine double minute gen2*) und anderen negativen Regulatoren vor (Barak et al., 1993, Wu et al., 1993). Mdm2 blockiert die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von p53, was eine Ubiquitinierung und Proteasom-vermittelte Degradierung begünstigt. Durch die Phosphorylierung von p53 und Mdm2 können beide Proteine nicht mehr interagieren und p53 wird aufgrund dieser kovalenten Modifikation aktiviert und stabilisiert. Die p53-Proteinmenge nimmt zu, auch als *overtranslation* bezeichnet und p53 akkumuliert (Levine, 1997; Perry und Levine, 1993). Die Halbwertszeit des normalerweise kurzlebigen Proteins erhöht sich. p53 bindet *in vivo* als Tetramer an die DNA (Lane, 1992; Levine et al., 1997) und kann Zielgene aktivieren oder hemmen und zelluläre Funktionen steuern.

Drei zelluläre Reaktionen sind nach Aktivierung von p53 beschrieben:

- (1) DNA-Reparatur durch Bindung von p53 an den humanen Promotor PCNA und verstärkte PCNA-Produktion
- (2) G1-Wachstumsstopp durch Induktion des Cyclin-abhängigen Kinase (CdK) - Inhibitors p21^{WAF1}, welcher an PCNA binden kann und somit Replikation und Elongation blockiert
- (3) Apoptose durch Induktion spezifischer Zielgene wie z.B. des Bcl-2 Antagonisten Bax sowie vermutlich durch Repression antiapoptotischer Gene (Vogelstein et al., 2000).

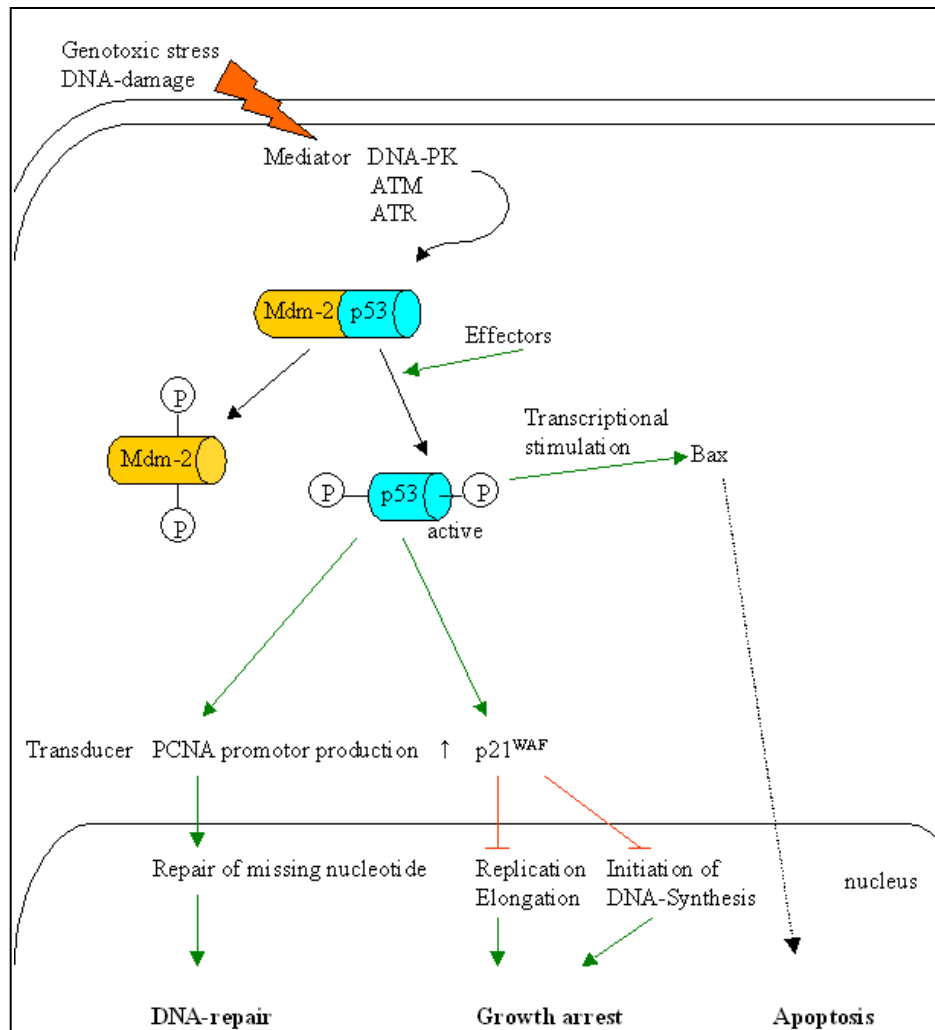


Abb. 7: Schematische Darstellung der p53-Wirkung (Ausschnitt aus Abb. 6) (Grafik A. Rode)

Im Falle eines nicht funktionellen Mdm2 oder eines blockierten Degradationsweges erfolgt ebenfalls eine p53 Akkumulation und damit erhöhte p53-abhängige Transkription. Die Degradation von p53 erfolgt über eine Spaltung durch die Cysteinprotease Calpain (nicht-lysosomale Calcium-aktivierte neutrale Protease) oder durch das Mdm2-kontrollierte Ubiquitin-Proteasom-System. Mdm2 markiert das Substrat durch das Anhängen eines Ubiquitinrestes und im zweiten Schritt wird dieses durch das 26S-Proteasom degradiert und Ubiquitin wieder freisetzt (Fang et al., 2000; Kubbutat et al., 1997). Das onkogene Mdm2 oder Hdm2 (*humane double minute gen2*) aus der Familie der RING-Finger Proteine (E3-Ligase), welche für die Übertragung von Ubiquitinresten verantwortlich sind, hat einen negativen Rückkopplungsmechanismus mit p53. Auf Aktivitätsebene wird p53 durch Mdm2 reguliert und p53 wiederum reguliert Mdm2 auf Transkriptionsebene (Barak et al., 1993; Wu et al., 1993). Die Akkumulation von Mdm2 verursacht die Degradation von p53. Wie in Abbildung 8 zu sehen, wirkt Mdm2 an der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53

und reguliert somit die Transkriptionsaktivität als auch die Ubiquitin-vermittelte proteolytische p53-Degradation (Chen et al., 1996; Haupt et al., 1996).

Fünf Domänen bestimmen die Funktion von p53 (Abb. 8). Am N-terminalen Ende des Proteins befindet sich die saure Transaktivierungsdomäne aus 60 Aminosäuren (Fields und Jang, 1990; Soussi et al., 1990). Diese regulatorische Schleife besitzt keinen Zink-Finger und beinhaltet eine hochkonservierte Region (HCD I, *highly conserved domain*). Dem angeschlossen ist eine zweite Transaktivierungsdomäne, welche prolinreich (PXXP) ist und Proteine mit einem SH3 (*Src-homology 3*)-Bindungsmotiv binden kann. Im Bereich von etwa 100-300 AS befindet sich eine zentrale sequenzspezifische DNA-Binde-Domäne, welche aus *Loops* und *Helices* besteht, die HCD II bis V enthält und der häufigste Ort für *Hot-Spot* Mutationen des p53 ist. Es schließt eine Tetramersierungsdomäne an, die aus Strängen und Helices besteht, welche der Oligomerisierung dienen und sich etwa im Bereich der AS 323 – 356 befindet. Am C-terminalen Ende liegt eine basische, allosterische Kontroll- oder Sensordomäne, welche der Regulation der spezifischen DNA-Bindung dient (363-393 AS).

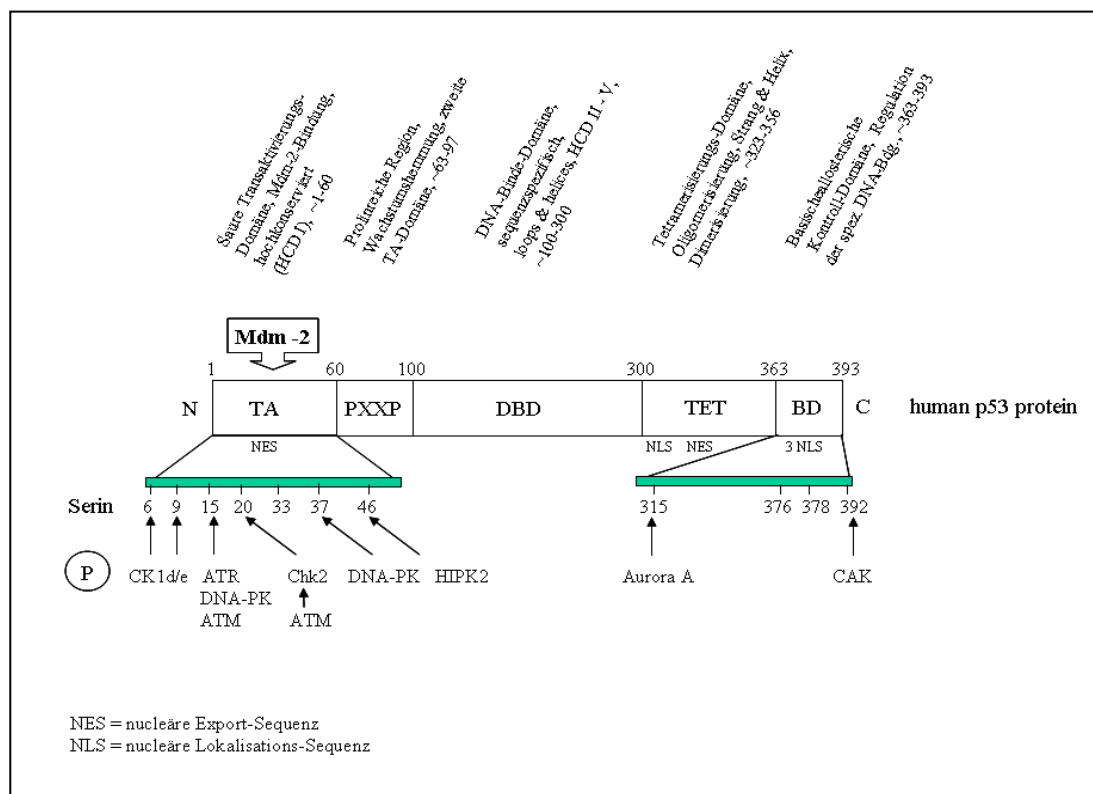


Abb. 8: Schematischer Aufbau des humanen p53-Proteins mit seinen Serinen (Phosphorylierungsstellen) und den zugeordneten Kinasen (Grafik A.Rode)

Serine des p53 werden durch diverse Kinasen phosphoryliert und p53 somit aktiviert. Serin 15 wird durch die ATM-Kinase, ein Produkt des ATM Gens, DNA-Protein-Kinase und durch MAPKS phosphoryliert. p53 unterliegt zahlreichen posttranslationalen Modifikationen. Neben der Phosphorylierung an seinen Serinen kann es sumoyliert, acetyliert, neddyliert, ubiquitiniert und methyliert werden (Gostissa et al., 1999). Als das am häufigsten veränderte Gen in Tumoren ist p53 meist punktmutiert, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt und damit zum Verlust des funktionellen Phänotyps (Greenblatt et al., 1994). Eine Mutation an Ser15 schwächt die Fähigkeit des p53 zur Apoptoseinduktion, indem die DNA-Bindefähigkeit innerhalb der Transaktivierungsdomäne und damit die Interaktion mit dem *cAMP response element binding protein* p300 gesenkt wird. Als Beispiel für eine durch mutiertes p53 verursachte Erkrankung sei das Li-Fraumeni-Syndroms (LFS) genannt, welches eine Keimbahn-Mutation des p53 ist.

p53 hat zahlreiche Zielgene, die es wiederum selbst regulieren (z.B. mdm2), die in die Zellzykluskontrolle involviert sind (p21 WAF1/CIP1, GADD45, WIP1, mdm2, EGFR, PCNA, CyclinD1, CyclinG, TGFalpha, 14-3-3sigma), die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (GADD45, PCNA, p21 WAF1/CIP1), die an der Angiogenese beteiligt sind (TSP-1, BAI1) als auch bei der Antwort auf zellulären Stress und Apoptose (bcl-2, RP53TG1, CSR, PIG3) (El-Deiry et al., 1993; Wu et al., 1993).

1.7 Apoptoseinduktion und p53-Modulation

Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase (Statine)

Statine gehören der Klasse lipidsenkender Pharmaka an, die durch Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterol-Biosynthese HMG-CoA-Reduktase in der Leber den Serum-Cholesterin-Level reduzieren, weshalb sie auch als HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren bezeichnet werden. Die Statine können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Es gibt zum einen über Fermentationsprozesse hergestellte Statine, zu denen Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin gehören, und synthetische Statine mit Fluvastatin, Atorvastatin, Cerivastatin und Rosuvastatin (siehe auch Tabellen 4,5,6 im Anhang).

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer dienen der Primär- und Sekundärprävention koronarer Herzkrankheiten und senken das kardiovaskuläre Risiko (Scandinavian Simvastatin Survival Study, 1994). Die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase reduziert unter Verbrauch von 2 NADPH das β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A zu Mevalonat, welches eine Vorstufe von Cholesterin ist. Die Regulation der HMG-CoA-Reduktase ist außerordentlich komplex. Kurzfristige Wirkungen der Statine sind die kompetitive Hemmung, allosterische Effekte und kovalente Modifizierung; langfristige Wirkungen hingegen sind die Induktion und Repression der Synthese von Cholesterin sowie die Modifikation des Abbaus (Thiery und Brügel, 2003). Die Hemmung des Enzyms führt zu einer Abnahme der intrazellulären Cholesterinbiosynthese, einer transkriptionellen Hoch-Regulation, gesteigerter Bildung mikrosomaler HMG CoA-Reduktase und Erhöhung der LDL-Rezeptordichte. Durch die

Hemmung der Cholesterinproduktion können Statine die Formierung neuer Plaques verhindern, bereits vorhandene Plaques verringern bzw. verkleinern, Plaques stabilisieren und unanfälliger gegenüber Rupturen machen (Crisby et al., 2001). Die Verbesserung der Endothelfunktion, die Modulation der inflammatorischen Reaktion, die Aufrechterhaltung der Plaquestabilität und die Verhinderung einer Thrombusbildung stehen dabei im Mittelpunkt. Neben den bereits bekannten Effekten der Inhibition der Cholesterinbiosynthese greifen Statine noch in eine Vielzahl weiterer Stoffwechselwege ein. Ihre pleiotropen Effekte sind antithrombotischer, antiinflammatorischer, antiproliferativer Wirkung. Sie werden auch prophylaktisch bei Altersdemenz und am Auge zur Prophylaxe bei Macula-Degeneration eingesetzt (Baghdasarian et al., 2004). Bei der Proliferation von SMC spielen verschiedene Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese eine bedeutende Rolle (Raiteri et al., 1997). Die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch Statine reduziert die Migration und Proliferation von SMC und induziert *in vitro* Apoptose in SMC aus der Media (Baetta et al.,

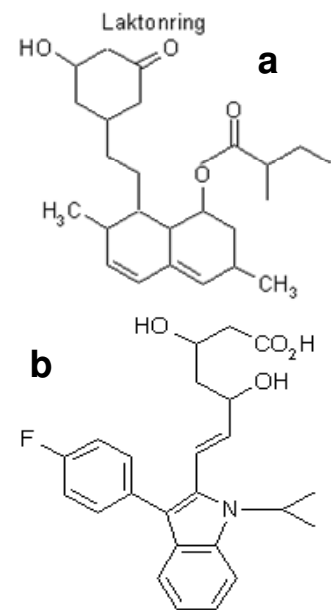


Abb.9: Strukturformeln von
a) Lovastatin und
b) Fluvastatin

1997; Guijarro et al., 1998). Häufige Nebenwirkungen (1-10%) sind Magen-Darm-Störungen, grippeähnliche Beschwerden, Kopfschmerzen, Infektionen, Hauterscheinungen (Ekzeme), Rhabdomyolyse (Auflösung quergestreifter Muskelfasern) und, wenn Muskelabbauprodukte die Nieren schädigen, akutes Nierenversagen (Graham et al, 2004). Konzentrationen von etwa 10 μM verursachen Apoptose, der Plasmaspiegel nach Applikation im Menschen bei den genannten Indikationen liegt bei etwa 23 bis 162 nM (Lovastatin). In Bezug auf Apoptose verursachen einige Statine eine Senkung von Bcl-2 und eine Hochregulation von Bax, was die Cytochrom-C-Freisetzung und Caspase-Aktivierung zur Folge hat (Blanco-Colio et al., 2002).

Pifithrin- α

Der reversible p53- Inhibitor Pifithrin-alpha ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{HBr}$; MW 367,30 g) blockiert p53-abhängige Apoptose und transkriptionelle Aktivierung, wobei die Gentranskription von u.a. Cyclin G, p21/Waf1 und Mdm2 inhibiert wird (Komarov et al., 1999). Der Name Pifithrin α (PFT α) leitet sich von *p-fifty-three inhibitor* ab. Das

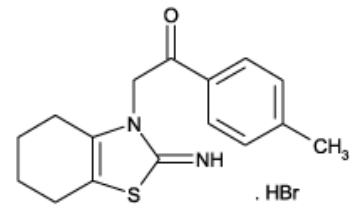


Abb. 10: Strukturformel von Pifithrin- α als Hydrobromid

neuroprotektive PFT α wurde erstmals als Substanz zum Schutz von Mäusen vor dem letalen genotoxischen Effekt der Krebsbehandlung entdeckt und kann die Blut-Hirn-Schranke durchqueren (Culmsee et al., 2001; Komarov et al., 1999). Unter PFT α -Einfluss kann eine Zelle UV-Strahlung und cytotoxische Substanzen wie Doxorubicin, Cisplatin und Etopoxid überleben. PFT α hemmt die p53-abhängige Expression von Bax, Bcl-2 und Mdm2. Es unterdrückt die Expression und Translokation des p53, reduziert die Stabilität des nukleären p53 (Komarov et al., 1999) und inhibiert Effekte wie die Caspase-Aktivierung und PARP-Spaltung (Culmsee et al., 2001). Durch die Ausschaltung des Tumorsuppressors erhöht sich die Tumorgefahr (Gorina und Pavletich, 1996). Bei gleichzeitiger Gabe von Doxorubicin inhibiert PFT α die Doxorubicin-stimulierte Proteinexpression von Bax, Bcl-xL und Mdm2, beeinflusst aber nicht die Phosphorylierung an Ser15.

Doxorubicin

Dieses cytotoxische Anthracyclin-Antibiotikum ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MW 462,45 g) wurde aus Kulturen von *Streptomyces peucetius* var. *caesius* isoliert (Arcamone et al., 1969). Auch als Adriamycin oder Hydroxyldaunorubicin bezeichnet, besteht es aus einem glykosidisch mit dem Aminozucker Daunosamin gebundenen Tetracyclinring. Es wirkt auf die S-Phase des Zellzyklus und interkaliert in DNA und RNA, was

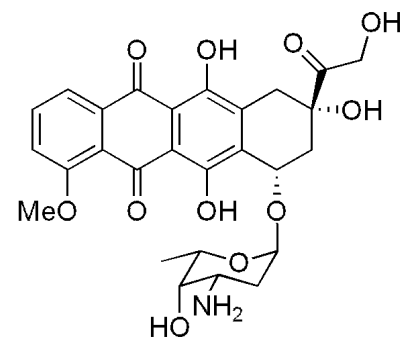


Abb. 11.: Strukturformel von Doxorubicin

Strangbrüche und Apoptose zur Folge hat. Des Weiteren hemmt es die Topoisomerase und induziert die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. H_2O_2 und Superoxidanion O^{2-} . Es verursacht morphologische und funktionale Schäden am Mitochondrium und induziert die Apoptose durch eine erhöhte Bax-Expression und Aktivierung von Caspasen (Lefrak et al., 1973). Indikationen für Doxorubicin sind solide Tumore (Mamma-, Bronchialkarzinom, Lymphome, Weichteilsarkome), Morbus Hodgkin und Morbus Kahler (Multiples Myelom, maligne Tumorerkrankungen des Lymphsystems). Es ist immunsuppressiv. Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression, Kardiotoxizität, Übelkeit, Erbrechen, Herzarrhythmien, Abnahme der weissen Blutkörperchen und Alopecie sind möglich (Elis et al., 2005).

Tab. 2: Doxorubicin (Dosierung im Menschen)

Arzneistoff	Handelsname	Dosierung
Doxorubicin	Doxil [®]	10 – 20 mg /d
	Caelyx [®]	20 – 50 mg /d (dox-HCl 2 mg/ml)
	Adriamycin [®]	50 – 60 mg/m ² /d

PRIMA-1

PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*) (2,2-bis(Hydroxymethyl)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-one) ist ein zell-permeabler p53-Reaktivator. Die antionkogene Substanz verursacht Apoptose indem sie p53 in seine aktive Konformation bringt und wieder DNA-bindefähig und damit funktionsfähig macht (Nahi et al., 2006).

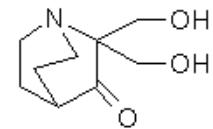


Abb. 12.:
Strukturformel
von PRIMA-1

1.8 Vaskuläre Prothesen - Patches

Bei Behandlung der Atherosklerose an der Arteria carotis durch eine Karotiden-Endarterektomie (*carotid endarterectomy*, CEA) wird die Karotis ausgeschält, das heisst, Ablagerungen von Fett und Cholesterol werden aus der Karotis entfernt und ein normaler Blutfluss zum Gehirn wiederhergestellt. Wenn die verengte Arterie nicht durch eine Naht direkt verschlossen werden kann, wird ein rundes, polygonales oder streifenförmiges Implantat zur Defektdeckung oder Lichtungserweiterung an Blutgefäßen verwendet, welches als Patch (engl. Flicken) bezeichnet wird. Dieser Patch kann aus verschiedenen Materialien bestehen, zum einen aus körpereigenen Venen oder aber aus Kunststoff wie Dacron oder PTFE (Polytetrafluoroethylen). Im Bereich des eingesetzten Patches kann Restenose erfolgen. Bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Patchmaterialien auf die Restenoserate nach CEA gibt es noch keine eindeutigen Daten, eine aktuelle Studie vermutet aber einen Zusammenhang zwischen den Patch-Typen und den Folgen nach CEA, wie Neointimaler Hyperplasie und Lumenabnahme (Aburahma et al., 2008).

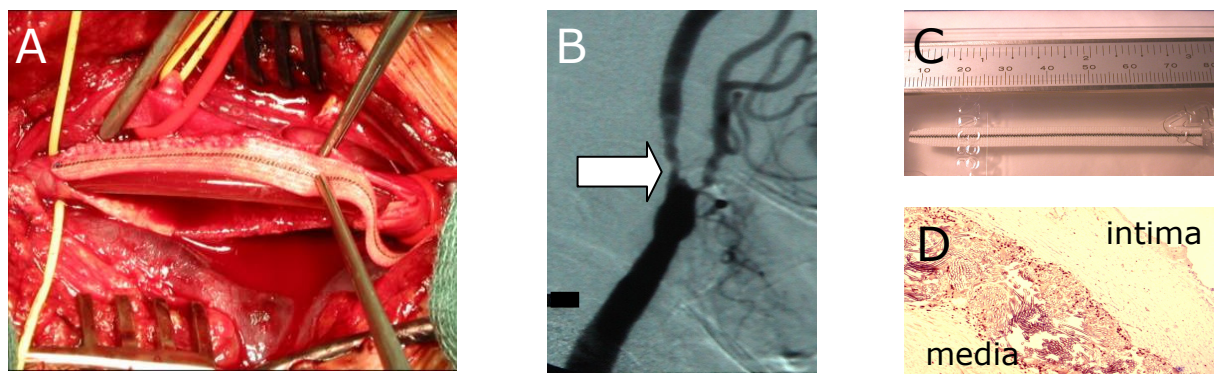


Abb. 13: Vaskulärer Patch bei CEA (A), Restenose-Angiogramm in einer Patchregion (B), Polyesterpatch (0,6 x 7,6 cm) (C), Querschnitt eines Patches mit media- und neointima-SMC nach Restenose (x 100) (D) (Foto: R. Brandl (A,B,D); A.Rode (C))

Zur Untersuchung der Zellproliferation und der Migration von Zellen unter Patcheinfluss wurden Formalin und Glutaraldehyd eingesetzt. Formaldehyd (CH_2O), durch die katalytische Oxidation von Methanol synthetisiert, wirkt als starkes Reduktionsmittel, kanzerogen und wird zur Konservierung, in der chemischen Industrie, zur Desinfektion, als thermoplastischer Kunststoff und als Klebstoff genutzt. Formalin, eine 37%ige wässrige Lösung des Formaldehyds, wirkt durch seine sehr reaktive Doppelbindung mit den Aminogruppe in Nukleinsäuren im Nukleus. Glutaraldehyd besitzt eine hohe Reaktivität und wird zur Sterilisierung, Konservierung, als Fixiermittel für Gewebe, als Crosslinker beim Beschichten von Elisaplatten mit Peptiden und für Enzyme durch Aldol-Kondensation genutzt.

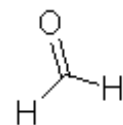


Abb. 14: Strukturformel von Formaldehyd

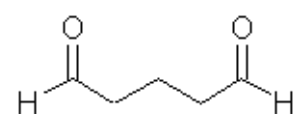


Abb. 15: Strukturformel von Glutaraldehyd

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Rolle des p53 bei der Apoptoseregulation in SMC als Bestandteil des vaskulären Systems und atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen. Die Wirkung des p53 beim Apoptoseablauf in der Neointima ist noch weitgehend unbekannt.

Die Regulation der Apoptose und die Rolle des p53 sollen im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung von Pharmaka in Stents zur gezielten Restenoseprävention als auch zur Vermeidung der Folgeerkrankungen untersucht werden.

Es ergeben sich folgende Fragen aus der Aufgabenstellung:

- Unterscheiden sich SMC der Neointima im Vergleich zur Media bei Gabe verschiedener pharmakologisch relevanter Substanzen bezüglich Proliferation und Apoptose?
- Unterscheiden sich SMC der Neointima im Vergleich zur Media bei Gabe verschiedener pharmakologisch relevanter Substanzen bezüglich der Expression der Proteine p53, (P-p53 Ser15 und Ser46) und PARP?
- Welche Rolle spielt p53 bei der Apoptoseregulation in SMC?
- Ist es möglich, in SMC durch die Regulation des p53 gezielt Apoptose zu induzieren oder zu inhibieren?
- Welchen Einfluss haben verschiedene Patchmaterialien auf Proliferation und Migration in SMC?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

27 GA $\frac{3}{4}$ Nadeln	Becton Dickinson, Heidelberg
48-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
BD Falcon (für FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Blot-Vorrichtung (Sandwich)	BioRad, München
Cryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Elektrophoresekammern	BioRad, DNA SUB CELL™, München
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	eltest, Bonn
Gelphotodokumentationssystem	BioRad, GelDoc 1000, Software, München
Gewebekulturflaschen mit Filter, steril (50 ml, 250 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Glasplatten, Spacer	BioRad, MünchenX
Großer Kühlschrank	Queue Nunc GmbH, Wiesbaden
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Latexuntersuchungshandschuhe, diverse, steril	
Magnetrührer	Heidolph, MR 2000
Meßpipetten 1,00, 2,00, 5,00, 10,00 und 20,00 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroskop	Olympus IX 50, Hamburg
Mikrotiterplatte	Becton Dickinson, Heidelberg
Mini Transferkammer	BioRad, München
Nucleobond-Membran Hybond (Nitrozellulose)	Amersham Biosciences, Freiburg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Ofen oder Heizblock	Perkin Elmer, DNA Thermal Cyclers 480, Wiesbaden
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten, diverse	Eppendorf, Research®, Abimed, Langenfeld
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Rührer	IKA Labortechnik, RCT basic, Staufen
Schüttler	IK IKA-VIBRA-VXR, Staufen
Schwämme	BioRad, München
Spannungsquelle (200 / 2.0 Power Supply)	BioRad Power Pac 1000, München
Sterilbank, BSB 4A	Gelaire, Flow Laboratories, Meckenheim
Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Nalgene, Rochester, USA

SuperSignal West Pico	Pierce, Rockford, USA
Tischkühlzentrifugen: Heraeus Multifuge 3 L R	Kendro, Hanau
3 L Jouan, MR 1822	Jouan, Fernwald
UV-Photometer	TECAN, GENios, Crailsheim
Vortexer	IKA Labortechnik, MS 2 Minishaker, Staufen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Zählkammer Neubauer Profondeur	Hecht, Sondheim
Zellschaber	Costar Corning incorporated, Corning NY

3.1.2 Verwendete Software

Xfluor4	TECAN, Crailsheim
CellQuest	Becton, Dickinson, Heidelberg
Isis Draw	MDL, Symyx
LabImage	Kapelan, Halle

3.1.3 Testsubstanzen

Lovastatin, Simvastatin	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Fluvastatin	Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz
Pravastatin	Bristol-Myers-Squibb, Wallinford, CT, USA

Alle Statine wurden in DMSO gelöst mit Ausnahme von Pravastatin (in PBS gelöst) und bei – 20 °C gelagert. Die maximale verwendete Endkonzentration von DMSO auf Zellen betrug 0,1 %.

PRIMA-1	Sigma, Taufkirchen
PFT- α	Sigma, Taufkirchen
Doxorubicin	Sigma, Taufkirchen
DHA	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA , in EtOH gelöst
Formalin	Sigma, Taufkirchen
Glutaraldehyd	Sigma, Taufkirchen

Patches	
#1 Polyester-Velour, Kollagen-beschichtet	Hemashield, Boston Scientific Medizintechnik GmbH, Ratingen
#2 Polyester, Kollagen-beschichtet	InterVascular, W.L.Gore & Associates GmbH, Putzbrunn
#3 Dacron, unbeschichtet	BARD GmbH/Angiomed, Karlsruhe
#4 Polyester, Gelatin-imprägniert, Fluoropolymer-beschichtet	Vascuthek, Hamburg
#5 PTFE	Vascugard

3.1.4 Reagenzien und Antikörper

Tab. 3.: Verwendete Antikörper (1 = primärer Antikörper; 2 = sekundärer Antikörper;

Cell Sign. = Cell Signaling; Verd. = Verdünnung; Lö. = gelöst in; m = monoclonal p = polyclonal)

	Antikörper	species	Fragment	Hersteller	Nr.	Verd.	Lös.	P/M
1	β-Aktin (SMC)	mouse	42 kDa	DAKO	M 0851	1:1000	Milch	m
1	Anti-β-Aktin	mouse	42 kDa	Sigma	A 5316	1:1000	Milch	m
1	Cleaved Caspase-9 (Asp330)	rabbit	37 kDa/17 kDa + 10 kDa	Cell Sign.	9501	1:1000	Milch	p
1	p53	rabbit	53 kDa	Cell Sign.	9282	1:1000	Milch	p
1	p53 (1C12)	mouse	53 kDa	Cell Sign.	2524	1:2000	BSA	m
1	Phospho-p53 (Ser15)	rabbit	53 kDa	CellSign.	9284	1:1000	BSA	p
1	Phospho-p53 (Ser 46)	rabbit	53 kDa	Cell Sign.	2521	1:1000	BSA	p
1	PARP	rabbit	116 (89 + 24) kDa	CellSign.	9542	1:1000	Milch	p
2	Anti-rabbit, HRP-linked IgG	goat	/	Cell Sign.	7074	1:2000	Milch	/
2	Anti-mouse HRP-linked IgG	sheep	/	ECL	NA931	1:2000	Milch	/

verwendete Antikörper und Reagenzien für die Transfektion:

MATra-si reagent IBA, Göttingen

Negative control siRNA Alexa Fluor 488, Quiagen

P53 pub. siRNA (5nm), Quiagen

HP validated siRNA 1027400, Quiagen

Silencer® validated siRNA 106141, Ambion

Affinity purified, rabbit anti-active caspase-

3 polyclonal antibody

BD Pharmingen, Hamburg

Amphotericin-Lösung 250 µg / ml

Sigma, Taufkirchen

Annexin V-FITC

BD Pharmingen, Hamburg

Bio-Rad DC protein assay

BioRad, München

BSA-Standard

Sigma, Taufkirchen

Chemicon Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit

Millipore, Schwalbach

D-MEM / HAM's F-12 1:1 (white)

GIBCO™, Invitrogen, Karlsruhe

DMEM/F-12 white

GIBCO™, Invitrogen, Karlsruhe

DMSO

Fluka Chemie, Sigma-Aldrich, Steinheim

Dulbecco's Modified Eagle Medium

PAN, Aidenbach

EGM (Endothelial Growth Medium)

PromoCell, Heidelberg

Fötales Kälber-Serum (FKS)

PAA, Pasching

Gentamycin-Lösung 50 mg / ml

Sigma, Taufkirchen

Marker, Längenstandard 100 bp

GIBCO™, Invitrogen, Karlsruhe

Nucleobond® AX

Macherey-Nagel, Düren

Sekundäntikörper goat anti-rabbit FITC

BD Pharmingen, Hamburg

Smooth MuscleCell Growth Medium II

PromoCell, Heidelberg

Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate

PIERCE, Perbo Science, Bonn

SupplementMix / SMCGMII

PromoCell, Heidelberg

Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (mit Phenolrot)	Sigma, Taufkirchen
TUNEL In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Applied Science, Mannheim

3.1.5 Sonstige Chemikalien

1-Butanol	Fluka Chemie, Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
APS	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
DPBS (= PBS -/-; ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)	PAN, Aidenbach
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Entwickler	AGFA, Kölln
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fixierer	AGFA, Kölln
Formaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	GIBCO™, Invitrogen, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fluka, Steinheim
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Methanol	Fluka Chemie, Sigma-Aldrich, Steinheim
MgSO_4	Merck, Darmstadt
Milchpulver (Magermilchpulver)	Vitalia GmbH Sauerlach
MTT	Sigma, Taufkirchen
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyruvat	GIBCO™, Invitrogen, Karlsruhe
PBS +/-	PAA, Pasching
Phenol, wassergesättigt	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluoride	Sigma, Taufkirchen
Propidiumjodid	Sigma, Taufkirchen
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Sodium Orthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Sodium Pyrophosphate	Sigma, Taufkirchen
TEMED	BioRad, München

Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

3.1.6 Puffer und Lösungen

Annexin V	2, 5 µl Annexin V + 500 µl PBS
Running Buffer	720 ml MilliQ H ₂ O oder PBS 80 ml Running Buffer (10 x)
Transferpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 800 ml MilliQ-H ₂ O 200 ml Methanol
TBS/Tween	10 ml 1 M Tris (pH 10,88) 33 ml 5 M NaCl 1000 ml MilliQ-H ₂ O 1 ml Tween
Milch	5,0 g Milchpulver 100 ml TBS/Tween
Probenpuffer	3,12 ml 1M Tris-Hcl pH 6,8 1 g SDS 2,5 ml b-Mercaptoethanol 0,5 ml 1 % Bromphenolblau 2 ml 50 % Glycerol 1,86 ml dd H ₂ O
Albuminlösung	20 ml TBS-Tweenlösung 1, 0 g BSA
MTT-Stock	500 mg MTT in 100 ml DMEM/F-12 (5 mg/ml)
MTT-Lösung	1:10 in DMEM/F-12 verdünnen 1ml MTT-Stock + 9 ml DMEM/F-12 (0,5 mg/ml) + 0,5 % FCS
Isopropanol-HCl	1 ml 4 M HCl + 100 ml Isopropanol (alternativ: 165 µl HCl (rauchend) + 50 ml Isoprop. p.a.)

Mengenangaben für 2 kleine Gele

	Lower Gel	Stacking Gel
Substanz	10 %	3 %
MilliQ-H ₂ O	4,10 ml	3,25 ml
Lower Tris	2,50 ml	-
Upper Tris	-	1,25 ml
Acrylamid	3,34 ml	500 µl
abschließend zugeben		
10 % APS	62,5 µl	30 µl
TEMED	3,75 µl	5 µl

Lysispuffer: **Spezialpuffer für Phospho-Protein**
für P-p38, P-ERK, P-c-jun, P-p53 Ser 15 + Ser 46

10 ml Na₄P₂O₇ x 10 H₂O (Sodium Pyrophosphate)
(50 mM/l) FW 446,1 (5,5765 g / 50 ml H₂O) / 0,25 M
5 ml NaF (Natriumfluorid) (50) FW 41,99
(524,875 mg / 25 ml H₂O) / 0,5 M
500 µl EDTA (5) 0,5 M
500 µl NaCl (50) 5 M
5 ml EGTA (5) FW 380,75 1:10 → 0,05 M
(0,1908 g / 9 ml H₂O + 1 ml 1 N NaOH [pH 8,14])
/ 0,5 M
50 µl HEPES (10) 1 M
28,95 ml H₂O
50 ml Endvolumen

Kurz vor Gebrauch für 1 ml des MasterMix:

100 µl Na₃VO₄ (2) (Sodium Orthovanadat) FW 183,9
(0,0920 g / 5 ml H₂O) / 100 mM → 1:2 = 50 mM → 1:2 = 25
mM → 160:40 = 20 mM in H₂O
5 µl PMSF (1) 20 mM Phenylmethanesulfonylfluoride

HBS-Puffer

11,9 g HEPES
16,4 g NaCl
10 mM KCl
1,3 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat
2 g Glucose
auf 1 l mit dest H₂O auffüllen
pH 7,1, sterilfiltrieren

TBE-Puffer (10x)

108 g Tris
55 g Borsäure
40 ml EDTA (0,5 M)
pH 8,3

3.1.7 Zellen

hSMC

Humane vaskuläre glatte Muskelzellen,
(*human vascular smooth muscle cells*)

hSMC ni humane Neointimazellen

hSMC m humane Media-Zellen

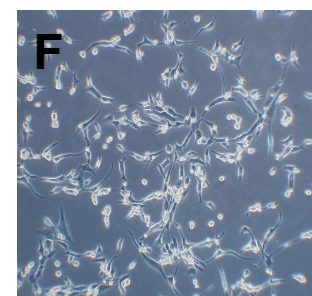
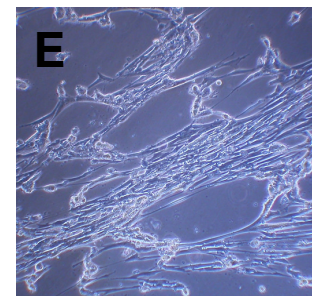
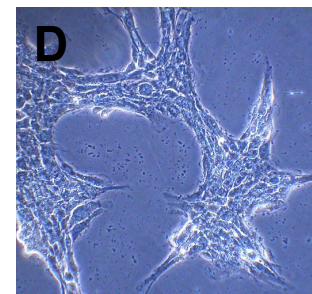
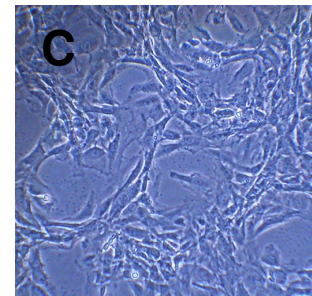
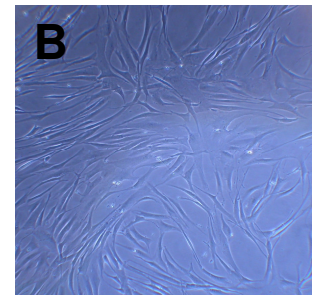
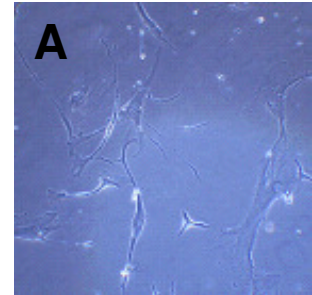
Isolation: W.Erl

Herkunft: Patienten-Carotis;
Media aus Stücken beim Einsatz eines Patches
entfernter gesunder Arterienwand,
Neointima aus entferntem Restenosematerial,
Prof. Brandl, Klinikum Schwabing, München

Passage: 3 - 15

Split-Ratio: 1 Woche, 1:3

Morphologie: Monolayer



rSMC

vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte,
(*rat vascular smooth muscle cells*)

rSMC ni Ratten Neointimazellen

rSMC m Ratten Mediazellen

Isolation: Karolinska Institut Stockholm, J. Thyberg

Herkunft: Media aus der Ratten-Aorta (Hedin et al., 1998),
Intima aus der Ratten-Carotis,
männliche Sprague-Dawley-Ratten (Yan ZQ, 1999)

Passage: 5 - 14

Split-Ratio: 1 Woche, 1:5 bis 1:10

Morphologie: Monolayer

L87

Immortale mesenchymale Stammzelllinie

Isolation: aus Knochenmark

Herkunft: Huss, R., 2000

Passage: unbekannt

Splitratio: 1 Woche, 1: 5

Morphologie: Monolayer

Abb. 16: hSMC m P5 (10x) (A), hSMC ni P5 (10x) (B), rSMC m P7 (x20) (C),
rSMC i P10 (20x) (D), hUA SMC P4 (20x) (E), L87 P? (10x) (F) (Foto : A.Rode)

hUA SMC

Humane glatte Nabelschnurarteriengefäßmuskelzellen,
(*human umbilical artery smooth muscle cells*)

Isolation: Rode A.
Herkunft: aus Nabelschnüren
Passage: 1-5
Splitratio: 1 Woche, 1 : 3
Morphologie: Monolayer

Kulturmedien:**rSMC:**

Dulbecco`s MEM / Nut Mix F-12 50:50	
[ohne L-Glutamin, mit Phenolrot]	500 ml
FCS [Fötales Kälber Serum]	50 ml

hUA SMC**hSMC:**

Smooth MuscleCell Growth Medium II	500 ml
SupplementMix	25,4 ml
(darin enthalten: <i>Epidermal Growth Factor</i>	0,5 ng / ml
<i>basic Fibroblast Factor</i>	2 ng / ml
Insulin	5 µg / ml
<i>Fetal Calf Serum</i>	5 %)
FCS [Fötales Kälber Serum]	50 ml
Gentamycin-Lösung 50 mg / ml	500 µl
Amphotericin-Lösung 250 µg / ml	100 µl

L87:

RPMI 1640 [mit L-Glutamin, mit Phenolrot]	500 ml
FCS [Fötales Kälber Serum]	50 ml

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolation von Zellen

hUA SMC aus Nabelschnur

Humane Nabelschnurzellen werden enzymatisch durch die Verwendung von Collagenasen, Trypsin und Chymotrypsin (Digestion) oder auf mechanischem Wege (Abschabung) isoliert. Frische Nabelschnur (5-10 cm lang) von gesunden Spendern wird am Tag der Niederkunft gesammelt und bis zum Präparieren im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Unter der Reinraumwerkbank wird diese in 1cm lange Stücke geschnitten und mittels einer Pinzette die Chorionplatten-Arterien aus den Nabelschnurstückchen entfernt, in PBS gewaschen, die Enden der Stücke entfernt und mit einem Skalpell dünne Ringe der Arterien geschnitten. Diese Ringe werden in Zellkulturflaschen überführt und auf dem Boden durch Schwenken mit PBS verteilt. Eine halbe Stunde lang wird die Zellkulturflaschen mit den Ringen hochkant ohne Medium zum Anhaften der Stückchen im Brutschrank bei 37 °C stehen gelassen, anschließend wird 1 ml Medium (SMCGM II mit 10 % FCS + G/A) vorsichtig dazugegeben. Einen Tag nach der Isolierung wird das Medium gewechselt. In regelmäßigen Abständen erfolgt eine mikroskopische Kontrolle und mit einer konfluenten Dichte ist nach etwa 1-4 Wochen zu rechnen (Abb. 17, 18) .

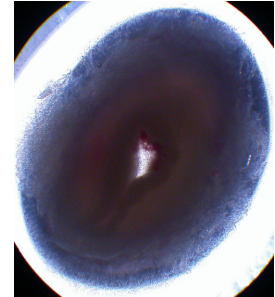


Abb. 17: Auswachsen von hUA SMC (Foto: A.Rode)

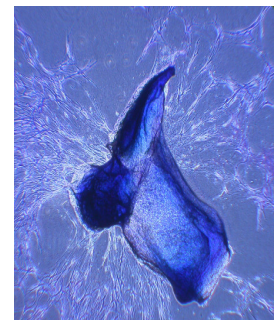


Abb. 18: Arterienstück in Kultur (Foto: W.Erl)

3.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellkulturen

Die Zellen werden aus dem Stickstoff (-195,6 °C) genommen und schnell aufgetaut. Die aufgetaute Zelllösung wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt und tropfenweise mit 8 ml Medium versetzt. Es wird dann für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml Medium aufgenommen, resuspendiert und langsam in eine Zellkulturflasche überführt. Zum Einfrieren werden die Zellen aliquotiert, das Pellet pro Zellflasche in 2 ml Gefriermedium resuspendiert und in die Cryoröhrchen in 1 bis 1,5 ml Portionen aufgeteilt und eingefroren. Das Gefriermedium besteht zu 70 % aus serum- und antibiotikafreiem Basalmedium, darüber hinaus aus 20 % FCS und 10% DMSO. Das Einfrieren erfolgt zunächst in einer Gefrierbox bei -80 °C, in der die Temperatur der Zellen pro Minute um ca. 1 °C gesenkt wird. Anschließend können die Zellen in den Stickstoff überführt werden.

3.2.1.3 Beurteilung/Pflege der Zellen

Die Kultivierungstemperatur aller Zellen beträgt 37 °C, der CO₂-Gehalt 5 %. Die optische Betrachtung hinsichtlich möglicher Kontaminationen wird täglich durchgeführt. Zellmorphologie und Konfluenz geben dabei Aufschluss über die Notwendigkeit der Passage. Nach Beurteilung der Zellen wird das Medium abgesaugt und neues auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden anschließend wieder im Inkubator verwahrt.

3.2.1.4 Lebendzellzahlbestimmung / Trypanblauausschlusstest

Mit dieser Färbung kann man vitale von toten Zellen unterscheiden, da membrangeschädigte Zellen mit Trypanblau angefärbt werden. Für eine Lebendzellzahlbestimmung werden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl *TrypanBlue Solution* im Verhältnis 1 : 1 vermischt. Das schwach basische Färbereagenz interkaliert mit der DNA, wenn es durch poröse Plasmamembranen toter Zellen diffundieren kann. Somit werden alle toten Zellen blau-violett angefärbt und sind optisch unter dem Lichtmikroskop von lebenden Zellen (hell-weiss) zu unterscheiden. Etwa 20 µl des Gemisches werden auf ein Hämozytometer gegeben und die Zellen mit Hilfe des Lichtmikroskops ausgezählt. Anhand der Formel: Ø Zellzahl von vier Groß-Quadraten : 4 x 20000 = Zellzahl/ml wird die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension berechnet.

3.2.1.5 Passage

Wenn in den Zellkulturflaschen eine hohe Konfluenz vorliegt, werden die Zellen gesplittet. Dieses geschieht folgendermaßen: Das Medium wird von den Zellen abgesaugt, die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit 2 - 4 ml Trypsin-EDTA-Gebrauchslösung vom Flaschenboden abgelöst und vereinzelt. Wenn die Zellen unter dem Mikroskop größtenteils vereinzelt zu erkennen sind, werden 10 ml Medium hinzugegeben (die Reaktion abgestoppt) und die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt. Es wird für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das Trypsin-haltige Medium wird abgenommen und das Pellet in ca. 10 ml frischem Medium gut resuspendiert. Je nach gewünschter Dichte wird die entsprechende Zellmenge abgenommen und in eine neue, 10 ml Medium enthaltende Zellkulturflasche gegeben.

3.2.1.6 Mycoplasmentest

Zur Kontrolle einer möglichen Kontamination der Zellkultur mit aeroben Mykoplasmen wird der Mykoplasmentest durchgeführt. Zur Mykoplasmandetektion wird 1 ml mindestens 2 Tage altes antibiotikafreies Medium benötigt, welches aus einer Zellkulturflasche entfernt wird. Durch eine spezifische PCR wird die Mycoplasmen-DNA amplifiziert und mittels einer Gelelektrophorese unter Verwendung einer Positiv- und Negativkontrolle detektiert.

3.2.2 Versuchsbedingungen

Die Zellkonfluenz unter Versuchsbedingungen beträgt 60 - 70 %. Die eingesetzte Zelldichte bei der Aussaat für den Versuch liegt für hSMC bei 5000 Zellen / cm² und für rSMC bei 10000 Zellen / cm².

3.2.2.1 MTT-Test - Proliferationsassay (E-screen)

Der MTT-Test ist eine quantitative kolorimetrische *in vitro* Methode, welche die indirekte Bestimmung von Zellzahlen und Proliferation über eine Messung der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen ermöglicht (Soto et al., 1992). Das in den Mitochondrien lokalisierte Enzym wandelt das gelbe, wasserlösliche Tetrazolium-Salz ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid], MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Reaktionsprodukt (MTT-Formazan) um (Abb. 19). Diese Umsetzung wird durch NADPH und NAD, welches durch Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen produziert wird, hervorgerufen. Die wasserunlöslichen Formazansalz-Kristalle werden mit Isopropanol extrahiert, um die Absorption der Lösung bei 570 nm photometrisch zu quantifizieren. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als indirektes Maß für die Vitalität der Zellen (Mosmann et al., 1983).

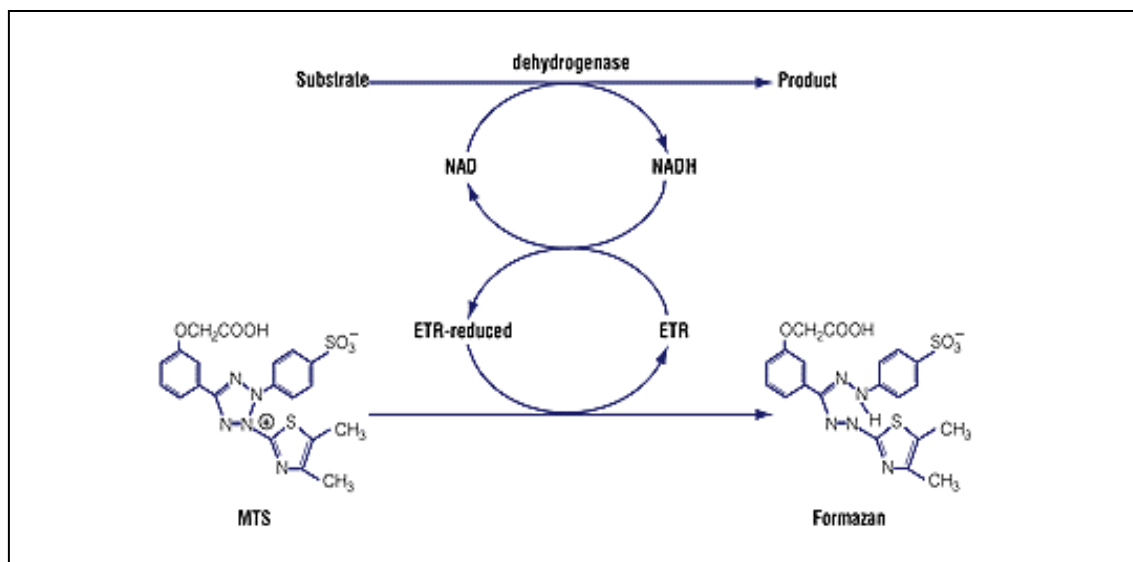


Abb. 19: Reaktionsmechanismus des Proliferationsassays (Promega-Kit)

Mit dem Proliferationsassay wird die Anzahl lebender Zellen mit Hilfe einer kolorimetrischen Reaktion bestimmt. Dabei erfolgt die Umwandlung eines Tetrazolium-Salzes (MTS) in Gegenwart reduzierender Enzymsysteme proportional zur Zahl lebender Zellen zu farbigem Formazan.

Zellen werden auf 48er Well-Platten ausgesät und kultiviert, bevor die Stimulation der Zellen mit Testsubstanzen für 24 - 72 h erfolgt. Anschließend wird das Kulturmedium abgegossen und die Zellen mit PBS +/- gewaschen, bevor 200 µl MTT-Lösung pro Well aufgeben werden. Um eine Hintergrund-Absorption mit einzubeziehen, werden Kontroll- Wells ohne Zellen, jedoch mit MTT-Lösung eingesetzt. Die Zellen werden für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wird nach der Inkubation verworfen und 100 µl Isopropanol-HCl pro Well zur Lyse aufgeben (0,04 M HCl). Als Kontrolle werden Wells ohne Zellen mit Isopropanol/HCl verwendet. Entstandene Kristalle werden durch wiederholtes Auf- und Abziehen mit der Pipette gelöst und 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Wellplatte wird im TECAN GENios mit Hilfe der TECAN Xfluor4-Software bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen. Die MTT- Aktivität wurde als Prozentwert relativ zur unbehandelten Kontrolle (=100%) dargestellt.

3.2.2.2 Durchflußzytometrische Untersuchung

Die FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen. Während die zu analysierende Zellpopulation in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passiert, werden verschiedene physikalische Parameter erfasst. Die FACS-Analyse wird zur Unterscheidung von Zellen einer Zellmischung aufgrund der relativen Partikelgröße, Komplexität, Granularität oder auch relativen Fluoreszenzintensität verwendet. Das Verfahren ermöglicht es, Zellen anhand der Streuung des Lichtes, das auf sie gerichtet wurde, zu unterscheiden und zu sortieren. Die zu untersuchenden Zellen werden dazu in eine Träger- oder Hüllflüssigkeit (Salzlösung) aufgenommen und hydrodynamisch fokussiert. Durch die Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Laserlicht wird von den Zellen gestreut und die so entstandene Ablenkung des Lichts detektiert. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Excitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden.

Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper/ Zelle. Es können drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Mit Hilfe des FACS-Gerätes können in 30 - 120 Sekunden 10.000 Zellen untersucht werden. Die gewonnenen Informationen über die einzelnen Zellen werden über einen Analog-Digital-Wandler in Signale umgewandelt, die in einer Häufigkeitsverteilung ausgewertet werden. Die gewonnenen Daten wurden in Form eines Dot Plots, in dem die Seitwärtsstreuung gegen die Granularität aufgetragen (Abb.20) ist, und als Histogramm der Fluoreszenzintensität ausgewertet.

Anhand des Histogramms (Häufigkeit als Funktion der Fluoreszenzintensität FL1-H) wird ein Bereich definiert. Die Ereignisse in diesem Bereich werden als Anteil der Gesamt Ereignisse berechnet.

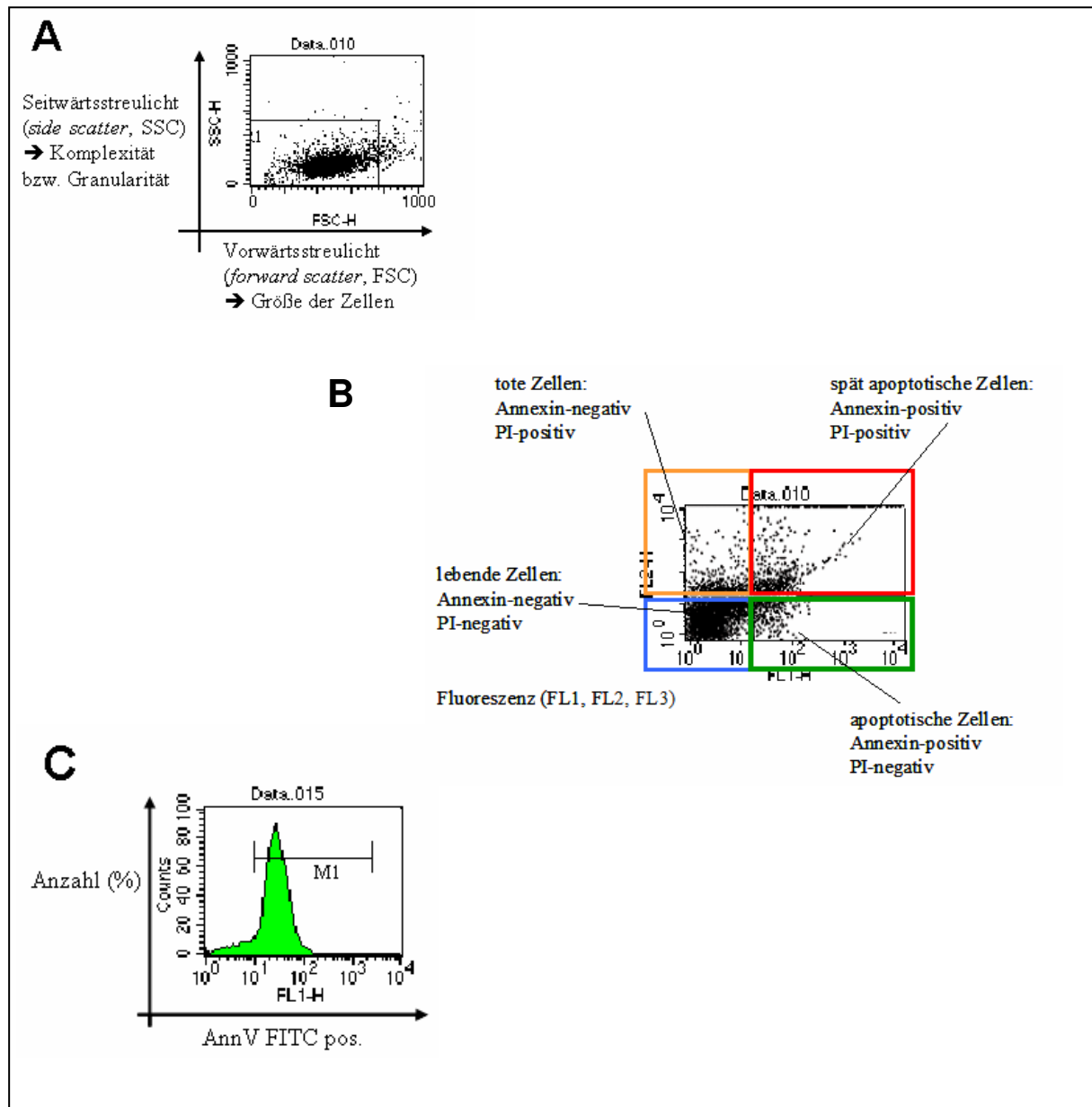


Abb. 20.: Ein- und Mehrparameter-Darstellung im FACS: Dot-Plot (A,B) und Histogramm (C) (Grafik A.Rode)

Annexin V

Annexin V ist ein 35-36 kD großes Protein, das Ca^{2+} -abhängig spezifisch an Phosphatidylserin (PS) binden kann. Das C-Ende des PS-Bindeproteins besitzt eine repetitive konservierte Domäne mit einer *endonexin loop*, an die Kalzium binden kann, wodurch eine Phospholipid-Interaktionsstelle geschaffen wird. Aus diesem Grund wird ein kalziumhaltiger Puffer verwendet. Wenn PS

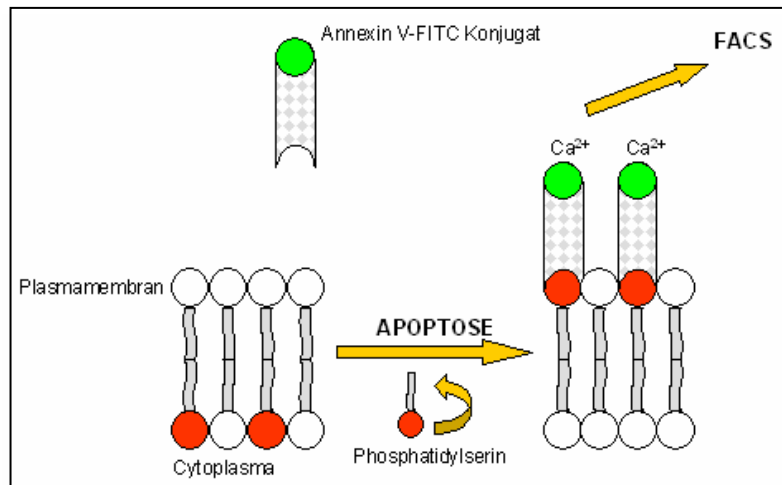


Abb. 21.: Umlagerung von PS während der Apoptose und Bindungs des Annexin V-FITC-Konjugats (Grafik A.Rode)

vermehrt auftritt, ist dies ein Nachweis für einen Verlust der asymmetrisch aufgebauten Plasmamembran und ein frühes Zeichen der Apoptose. PS, das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, tritt dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf (Translokation) (Abb.21). Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Annexin V - FITC (FITC = Fluorescein Isothiocyanat) in die Zellen eindringen und auch an die Innenseite der Membran binden. Bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V - FITC können apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. Man kombiniert daher die Annexin V – FITC - Markierung mit einer Propidiumjodid (PI)-Färbung. Das PI dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein und interkaliert in die DNA. FITC fluoresziert bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm grün und PI bei einer Wellenlänge von 617 nm rot. Vitale, gesunde Zellen sind daher Annexin V -negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-negativ, nekrotische oder sekundär nekrotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-positiv. Die Zellen werden nach Behandlung mit den Testsubstanzen unter Verwendung von Trypsin/EDTA geerntet. Die Verweilzeit des Trypsins sollte möglichst kurz sein, da sonst die Plasmamembran geschädigt werden kann, was falsch positive Werte zur Folge hat. Es werden auch der Zellüberstand sowie die Waschflüssigkeit kollektiv pro Probe gesammelt und im Überstand schwimmende mit durch das Trypsin gelösten Zellen gemischt. Die Lösungen werden bei 1000 rpm (~200 x g) 5 min zentrifugiert, der dabei entstehende Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 1% FCS) resuspendiert. Jeweils 50 µl der Zellsuspension wird in eine 96-Well-Platte überführt und mit 50 µl Trypanblau versetzt, um im Hämatocytometer eine Zellzählung der toten und lebendigen Zellen durchzuführen. Weitere 100 µl der Zellsuspension werden in ein

FACS-Röhrchen mit 100 µl Annexin V –Lösung versetzt und durch leichtes Schütteln vermengt. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C (Inkubator) werden die Zellen auf Eis gekühlt und jeweils mit 10 µl Propidiumjodid (50 µg/ml stock in 1x PBS) versetzt. Je 10000 Zellen werden im FACScan (Becton Dickinson) gemessen und die Daten mit Hilfe der Cellquest-Software ausgewertet. Ein drittes Aliquot von 350 µl Zellsuspension wird mit der gleichen Menge an 37%igem Formaldehyd fixiert und bei 4 °C im Kühlschrank mindestens 10 min gelagert. Nach zweifachem Waschen wird das Zellpellet in 300 µl PBS + FCS resuspendiert und 200 µl davon für die Caspase-3- Messung und 100 µl für die TUNEL-Messung aliquotiert.

Caspase-3

Die Caspase-3 (32 kDa) liegt als inaktives Vorläuferprotein im Cytoplasma vor und wird durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Durch Ligandenbindung an einen Rezeptor (Fas/APO-1 und TNFR1) folgt eine proteolytische Aktivierung. Dabei wird das Protein an spezifischen Stellen (drei oder vier Aminosäuren gefolgt von einem Aspartatsäure-Rest) durch Proteasen wie Serinproteasen oder Granzym B gespalten, was eine Heterodimerbildung des Enzyms zur Folge hat. Der verwendete Antikörper erkennt bevorzugt aktive (gespaltene) Caspase-3, wodurch Apoptose detektiert werden kann. Unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper wird eine Durchflusszytometrie durchgeführt.

Für die Caspase-3-Messung wurden 100 µl der Probe mit 10 µl 1 % Saponin 10 min auf Eis permeabilisiert und anschließend einmal gewaschen. 100 µl Probe werden mit 1 µl Primärantikörper (*anti-active caspase-3*) versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach drei Waschschritten wird die Probe mit 0,5 µl des Sekundärantikörper (FITC) für eine weitere Inkubation von 45 min auf Eis versetzt. Das abschliessende Fixieren erfolgt nach zweimaligem Waschen durch den Zusatz von 2 % Formalin bevor die Probe im FACScan gemessen werden kann. Als Kontrolle werden Zellen verwendet, die nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt wurden verwendet.

TUNEL

Die Abkürzung TUNEL steht für “Terminale Desoxyribosyl-Transferase *mediated* dUTP Nick End Labeling”. Bei dieser Technik werden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch die Caspase-aktivierten Nucleasen entstehen, wodurch eine Identifizierung apoptotischer Zellen möglich ist. DNS-Fragmente, die später bei der Apoptose entstehen, kann man durch Färbung der freien 3`-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion identifizieren. Das Enzym TdT (Terminaltransferase) hängt an die entstehenden freien Enden markierte dNTP-Nukleotide an. Bei direkten, schnellen Verfahren ist dies Fluorescein-dNTP. Bei indirekten, sensitiveren Verfahren werden zum

Beispiel Biotin-dUTP und ein Streptavidin-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff oder die Enzyme alkalische Phosphatase oder Peroxidase eingesetzt. Grundsätzlich kann man solche Tests mikroskopisch oder durchflußzytometrisch (FACS) auswerten.

Für die TUNEL-Messung werden 100 µl der Zellsuspension mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und auf Eis gekühlt. Nach zwei Waschschritten wird das Zellpellet mit 50 µl TUNEL *reaction mixture* (*Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit*) versetzt. Die Negativkontrolle beinhaltet nur *label solution*. Für 60 min wird bei 37 °C inkubiert, nach zweimaligem Waschen das Pellet in 250 µl PBS resuspendiert und im FACScan gemessen.

Die Auswertung erfolgt als Einparameterdarstellung (Histogrammplot) oder korrelierte Zweiparameterdarstellung (Punkteplot) (Abb. 21). Die Zellen werden aufgrund ihrer Anfärbbarkeit oder der mittleren Fluoreszenzintensität analysiert. Im Histogrammplot kann man durch das Setzen eines Markers die Zellpopulation in "positiv" oder "negativ" einteilen und die entsprechenden Prozentwerte berechnen. Dabei wird nur Fluoreszenz 1 (FL-1) ausgewertet. Beim Punkteplot lassen sich gleichzeitig zwei Fluoreszenzen analysieren (FL-1/FL-2). Die mittlere Fluoreszenzintensität wird in Kanälen berechnet.

3.2.2.3 Extraktion von Gesamtprotein - Proteinbestimmung

Zu den proteinbiochemischen Methoden gehört die Extraktion von Gesamtprotein und die folgende Proteinbestimmung. Die Zellen werden in 10 cm Petrischalen ausgesät und nach Inkubation geerntet. Die Ernte der Zellen erfolgte auf Eis nach vorherigem zweifachen Waschen mit eiskaltem PBS. Die Zellen werden in 1 ml eiskaltem PBS mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt, bei 4 °C 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 150 µl Spezial-Phosphoprotein-Lysepuffer durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle resuspendiert und anschliessend mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 14.000 x g für 10 min bei 4 °C werden Membran- und DNA-Reste entfernt. Der Überstand wird vorsichtig in ein neues 0,5 ml Röhrchen überführt und in Aliquots zur Proteinbestimmung und für den Westernblot geteilt, welche bei – 80 °C gelagert werden.

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts wird mit dem Bio-Rad DC Protein Assay Kit durchgeführt. Dabei werden die Reagenzien gemäß Herstellerangabe gemischt und eine BSA-Verdünnungsreihe mit Proteinkonzentrationen von 0 bis 5 mg/ml als Eichgerade angesetzt. Von zweimal 5 µl jeder Probe wird in einer Mikrotiterplatte in einem UV-Photometer (TECAN) mit der Xfluor4 Software bei einer Wellenlänge von 690 nm (Referenzwellenlänge 0) die Absorption gemessen. Mittels Excel wurden die Ergebnisse ausgewertet und anhand der Eichkurve die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

3.2.2.4 Western Blot

Der Nachweis der Proteine wird mittels Western Blot mit SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) durchgeführt (Burnette, 1981).

Die Denaturierung der Proteine erfolgt, indem jeweils 50 µl der Extrakte mit 12,5 µl Sample Buffer versetzt, kurz anzentrifugiert und 10 min bei 95 °C erhitzt werden. Die Proben werden auf Eis gekühlt und für die Elektrophorese verwendet. Das Gel wird mit den Proteinproben beladen und parallel 10 µl Marker eingesetzt. Die Proteintrennung erfolgt bei 200 V für 45 – 50 min. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wird das Gel mit den aufgetrennten Proteinproben in ein Sandwich eingesetzt, das heißt, sie wird auf beiden Seiten von jeweils einem Schwamm und einem Filterpapier bedeckt und auf nur einer Seite von der Membran, auf die die Proteine zu übertragen sind. Der Transfer erfolgt bei 4 °C, etwa 118 Volt (Ampèrezahl zwischen 0,18 und 0,25) unter Rühren für eine Stunde. Die Membran wird nun mit der Proteinseite nach oben eine Stunde bei RT mit einer Milchlösung geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern, anschliessend mit TBS gewaschen bevor der erste Antikörper aufgegeben wird. Nach der Inkubation wird die Membran wiederholt gewaschen und der zweite Antikörper (HRP) aufgegeben. Die Detektion erfolgt mittels des Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrats von PIERCE, wobei ein gleicher Anteil Luminol/Enhancer und Peroxide Puffer gemischt und auf die Membran gegeben werden.

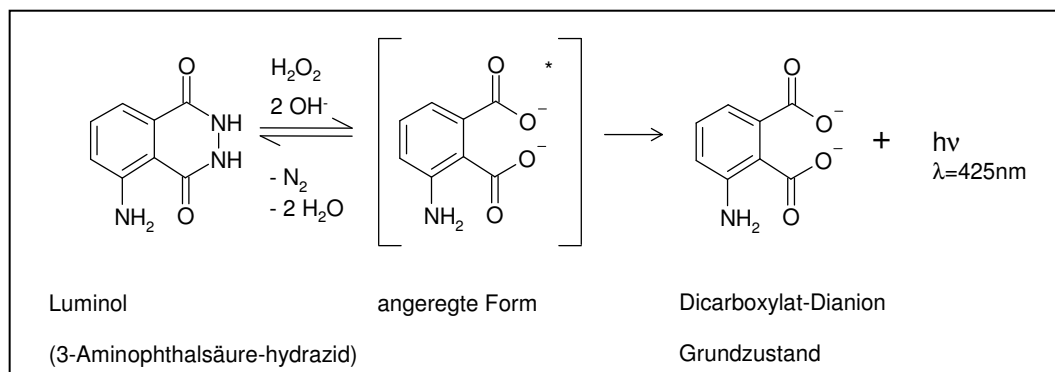


Abb. 22: Prinzip der Chemolumineszenz, Umwandlung des Luminols (Grafik A.Rode)

Dabei wird Luminol durch die Peroxidase zu einem doppelt ionisierten Anion und weiter zu einem angeregten Zustand als Triplett umgewandelt und oxidiert (Abb. 22). Durch die Emission eines Photons wird das Triplett in den Grundzustand als Dicarboxylat-Dianion versetzt. Durch die Freisetzung des Photons wird ein Autoradiographiefilm an den jeweiligen Stellen belichtet, dieser dann entwickelt und fixiert und die detektierten Proteinbanden analysiert. Als Kontrolle für das Auftragen gleicher Proteinmengen in jeder Probe wird zusätzlich als Nachweis β -Aktin (1:5000) auf den selben Membranen detektiert.

In der Dunkelkammer wird die Membran mit einem Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) in Kontakt gebracht, der nach der für die Antikörper spezifischen Expositionszeit entwickelt und fixiert wird.

Das Entfernen von Reaktionslösung sowie von Primär- und Sekundärantikörpern auf Western Blot Membranen erfolgt mittels der *Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution* von Chemicon durchgeführt. Nach dem Strippen kann die Membran einer weiteren Detektion mit neuen Antikörpern unterzogen werden. Um Western Blots nach dem Trocknen der Membran zu reaktivieren, wird die Membran schonend in *Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit* von Chemicon hydratisiert und kann nach einem Stripping-Schritt, in dem gebundene Antikörper gelöst werden, wieder verwendet werden.

3.2.2.5 siRNA

siRNA (*small interfering RNAs*) sind kleine einzelsträngige RNA-Moleküle, meist 21–28 Nukleotide lang, die in der Gentechnik zur RNA-Interferenz und in *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) eingesetzt werden. Entdeckt wurde die siRNA durch PTGS in Petunien, in dem Schimmelpilz *Neurospora crassa*, in Algen und *Caenorhabditis elegans*. (Morris, 2008). Der Mechanismus ist ein natürlicher Vorgang, um in eukaryotischen Zellen die Expression einzelner Gene zu hemmen. Dabei wird die RNA sequenzspezifisch gespalten, die Translation damit blockiert und somit das betreffende Gen abgeschaltet. Der Abbau von Fremd-RNA dient der Abwehr gegen Viren und anderer Pathogene, der Regulation von zellulären Prozessen wie z.B. Wachstumsregulation, Differenzierung und Apoptose. Als Werkzeug der Gentechnik wird die siRNA zum Ausschalten spezifischer Gene (*knockdown*) durch komplementäre Sequenzen genutzt und mittels Transfektion in die Zelle eingebracht. Sie entsteht durch das Schneiden der längeren dsRNA durch die Endonuclease Dicer (Typ III Ribonuclease) in siRNA-Fragmente von ca. 22 Nucleotiden. Längere Sequenzen hätten eine Interferonantwort und unspezifische Reaktionen zur Folge. Der Prozess findet am RISC (*RNA-induced silencing complex*) Proteinkomplex statt, wo die ds RNA mit ihren Targetsequenzen (je nach Methode mit AA beginnend und UU endend) endonucleolytisch geschnitten und exonucleolytisch ein Strang entfernt wird. Die siRNA bindet über Basenpaarungen die Ziel-RNA und diese wird meist gespalten. Seltener kommt es zur Inhibition der Translation, was durch eine geringere Menge an siRNA hervorgerufen werden kann.

Vorteile der chemisch synthetisierten siRNA sind die verfügbaren Mengen sehr reiner RNA, die schnelle Herstellung, das mögliche Markieren mit Fluoreszenzfarbstoffen, die relativ einfache Transfektion und eventuell bereits validierte Sequenzen. Nachteile sind die entstehenden Kosten und die selbstständige Entfernung der Konstrukte nach einigen Tagen, was Langzeitstudien schwierig macht.

3.2.2.6 Transfektion und Transduktion

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd- DNA und -RNA in Säugerzellen bezeichnet. Sie dient der Aufnahme und Expression fremder Nukleinsäuren, was zur Untersuchung der Genregulation und -funktion genutzt werden kann. Es gibt verschiedene Methoden, um DNA in eine Zelle einzubringen, grundlegend werden zwei Techniken unterschieden. Die DNA lässt sich entweder direkt oder durch Viruspartikel (Infektion) bzw. Mikroinjektion in die Zelle einschleusen. Das zeitweilige Einbringen der DNA in die Wirtszelle wird als transiente Transfektion bezeichnet, der dauerhafte Einbau in das Genom als stabile Transfektion.

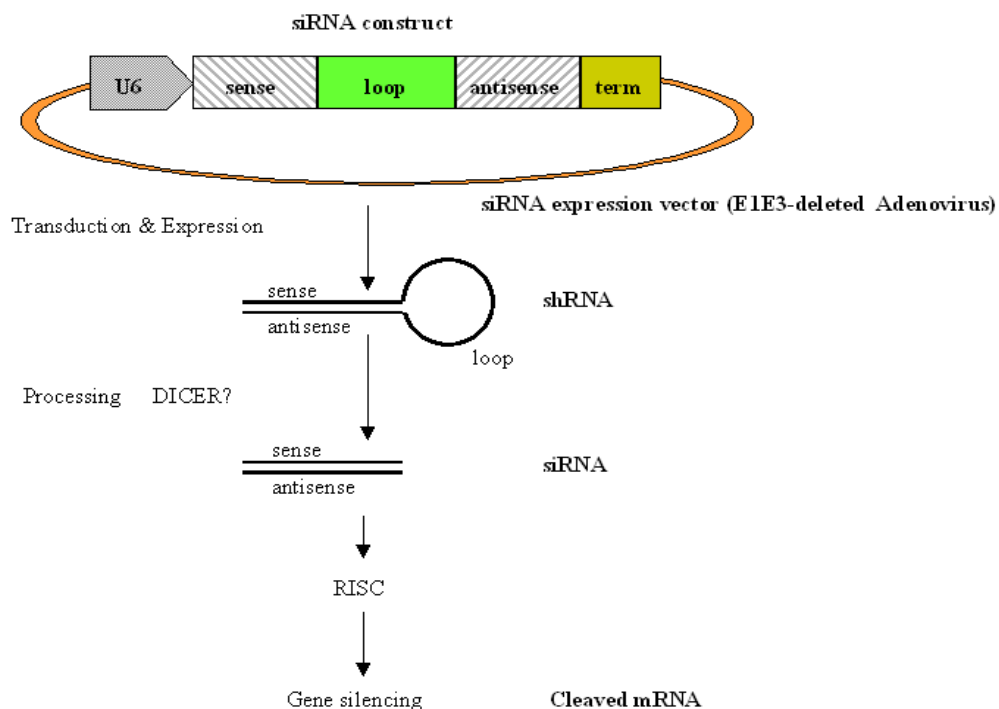


Abb. 23: Schema des siRNA-Konstruktes und der shRNA (Grafik A.Rode)

Bei transienter Transfektion von chemisch synthetisierter exogener siRNA wird meist siRNA in entsprechenden Vektoren (z.B. Plasmiden) exprimiert. Als Vehikel für den Gentransfer können virale Vektoren eingesetzt werden, was als Transduktion bezeichnet wird. Das Genmaterial wird in das Wirtsgenom transferiert und transient eingebaut, so dass die transduzierten Gene vorübergehend exprimiert werden. Es handelt sich um E1E3-deletierte Adenoviren aus der Familie der Adenoviridea, welche ikosaedrische Form haben, über keine Hülle verfügen und ein lineares etwa 36 kb grosses dsDNA –Genom besitzen. Als Vektoren können sie bis 8 kb DNA transportieren und in primären als auch nicht-proliferierenden Zellen transduzieren. Die adenovirale Transfektion ist eine transiente Methode; das Maximum der Expression der transfizierten Gene liegt bei 2 - 4 Tagen und nimmt danach ab. Zunächst

wird die gewünschte DNA-Sequenz in das Virengenom kloniert, wobei bestimmte DNA-Bereiche des viralen Genoms ersetzt und die Viren replikations- inkompetent werden. Vorteil der zeitweisen Ersetzung ist die nun nicht mehr unkontrollierte Vermehrung im Wirt. In die E1-Region wurde eine shRNA-Expressionskassette (*short hairpin* siRNA) kloniert, die durch einen U6 Promotor reguliert wird. Der humane U6 Promotor ist eine RNA Polymerase TypIII, welche snRNA (*small nuclear RNA*) / *housekeeping genes* transkribiert, am Splicing beteiligt ist und für Zellwachstum und Zellzyklus verantwortlich ist. Die Kassette besteht aus einem PCR-Produkt, was eine Promotor-Sequenz (U6) und End-Sequenz beinhaltet, welche das DNA-Insert (hairpin siRNA) umschliessen (Abb. 23). Nach Zugabe der Viren zu den Wirtszellen dienen die aus dem Capsid hinausragenden Proteinfibrillen und daran der C-terminale Kopf zur Bindung an zelluläre Rezeptoren des Wirtes. Die Ratio von infektiösen Partikeln zum zu infizierenden Objekt, in diesem Fall Adenovirus zur glatten Gefäßmuskelzelle im Well, wird als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet. Die Aufnahme des Virus in die Zelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Greber et al., 1993). Die durch den Virus eingebrachte DNA wird transkribiert, die siRNA exprimiert und das gewünschte Gen ausgeschaltet. Das grün fluoreszierende Protein (GFP, *green fluorescent protein*) wurde ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt, fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün und kann mit anderen Proteinen fusioniert werden, wodurch diese in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen zeitlich und räumlich fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar sind. Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren bei einer Molekülmasse von 26,9 kDa. Die Anregungswellenlänge für das unmodifizierte, natürlich vorkommende GFP liegt bei 395 nm und 475 nm, die Emissionswellenlänge bei 509 nm. eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) ist die Codon-optimierte Variante, welche gegenüber dem Wildtyp eine 5-10fach stärkere Expression aufweist. Die SMC der Neointima werden mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen auf 6-Well Platten in serumfreiem Medium ausgesät und die Zellen nach 24 h Inkubation mit Ad-eGFP bei MOI 500 transduziert. Nach 48h werden die Zellen passagiert und von 5000 dieser Zellen der prozentuale Anteil an fluoreszierenden, das heisst, erfolgreich transduzierten Zellen, mittels FACS ermittelt. Als Kontrolle dienen 5000 nicht transduzierte Zellen. Eine zweite Charge Zellen wird wie beschrieben ausgesät und je ein Well mit Ad-sh-p53 (MOI 500), Ad-sh-p53 (MOI 500) in Kombination mit Ad-eGFP (MOI 250) und Ad-eGFP (MOI 500) transduziert. Nach 48h werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop photographiert. Die relative Zahl fluoreszierender Zellen dient als Maß für die Transduktionseffizienz. Der immunologische Nachweis des p53-*Knockdowns* in mit Ad-sh-p53 transduzierten SMC erfolgt durch die Extraktion des Gesamtproteines. Aus je 10^3 nicht-transduzierter Kontrollzellen und mit Ad-sh-p53, Ad-sh-p53/Ad-eGFP oder Ad-eGFP transduzierten Zellen wird 72 h nach Viruszugabe das Gesamtprotein isoliert und die Expression von p53 anschließend im Western Blot nachgewiesen.

Die *Magnet-Assisted Transfection* (MATra) ist eine Form der Magnetofektion, dem Gentransfer unter Einfluss eines magnetischen Gradientenfeldes auf Genvektoren, welche mit magnetischen Nanopartikeln verbunden sind. Nucleinsäuren werden dazu an Eisenoxidpartikeln, die mit kationischen Molekülen beschichtet sind, gekoppelt und die zu transfizierenden Zellen auf eine magnetische Platte platziert. Die an die magnetischen Partikel assoziierte DNA wird durch das Magnetfeld in Richtung Zellen gezogen und endozytotisch aufgenommen.

Zellen werden auf 48 Well-Platten ausgesät und für 24 h bis 48 h kultiviert. 3 µg der zu transfizierenden siRNA werden mit 200 µl serum- und supplementfreiem Medium gemischt. Die gelöste siRNA wird anschliessend in MATra-A Reagenz (je 3 µl MATra für 3µg siRNA) aufgenommen, gemischt und für 20 min bei RT inkubiert (Komplexbildung). Das Medium der kultivierten Zellen wird durch 2 ml neues Medium ersetzt und der siRNA-Beadmix zu den Zellen gegeben und schnell gemischt (200 µl des Mix bei 2 ml Medium), bevor die Well-Platte auf die MATra-Magnetplatte platziert wird. Es folgt eine 15 minütige Inkubation bei 37°C, nach der das Medium erneut gewechselt wird. Für 24 h bis 72 h werden die Zellen weiter kultiviert, bevor eine FACS-Analyse erfolgt. Die Zellen werden mit Formalin fixiert und, um die Transfektionseffizienz und Auswirkung der siRNA zu testen, mit entsprechenden Antikörpern gefärbt.

3.2.2.7 Migrationsassay und Proliferation

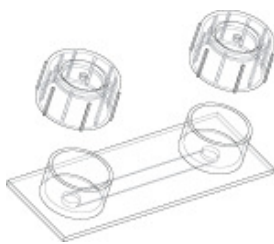


Abb: 24:
y-Slide-Ibidi-Chamber
für chemotaktische
Untersuchungen
(Grafik von Ibidi)

Um die Wirkung verschiedener Typen beschichteter und unbeschichteter Patches und ihre *in vitro*-Effekte auf SMC zu untersuchen, werden SMC aus humanen Karotiden explantiert und in SMC-Wachstumsmedium kultiviert. Die Messung der Zellproliferation erfolgt mittels eines MTT-Tests, die Feststellung der Migration der Zellen mit Hilfe von speziellen Zellkulturgefäßen in einem Formaldehyd- oder Kollagen-Gradienten. Dazu werden Ibidi-Kammern verwendet, die Zellkulturgefäße, Deckgläschen sowie eine Durchflusskammer miteinander kombinieren. Durch dieses System können lebende oder fixierte Zellen mikropisch betrachtet, Färbungen zeitgleich verfolgt und Zellmigration in chemischen Gradienten beobachtet werden. Um die Migration zu untersuchen, werden die Zellen mit einem Konzentrationsgradienten ausgesät und ihre Migration anhand eines gekennzeichneten Startpunktes beobachtet. Kollagen, das als Patch-Beschichtungsmaterial verwendet wird, und Formaldehyd, welches als quervernetzendes Agent benutzt wird, werden untersucht. Die Anzahl der Zellen in einem durch die Startlinie begrenzten Beobachtungsareal gibt dabei Aufschluss über die Migration. Des Weiteren werden die Zellen morphologisch

betrachtet und dazu eine Phalloidin-Färbung durchgeführt. Das fluoreszierende Phalloidin, ein Toxin aus *Amanita phalloides* (Vaill. ex. Fr.), einem grünen Knollenblätterpilz, bindet an F-Actin und macht dadurch das Cytoskelett sichtbar (Löw und Wieland, 1974). Kleine Patchstücke werden ausserdem mit Hilfe von Agar auf dem Boden einer 6-Well-Platte fixiert und mit Zellen besät sowie das Zellwachstum an diesen Stellen beobachtet. Dabei wird nach 2 Tagen die Ratio der Zellzahl am Rand des Wells mit der Mitte des Wells berechnet. Die verwendeten Patchstücke bestanden aus Polyester-Velour, Kollagen-beschichtet (Patch Typ #1), Polyester, Kollagen-beschichtet (Patch Typ #2), Dacron, unbeschichtet (Patch Typ #3), Polyester, Gelatin-imprägniert, Fluorpolymer-beschichtet (Patch Typ #4) und PTFE (Patch Typ #5).

3.2.2.8 Statistische Auswertung

Mit Programm Excel Version 97 werden die Messdaten ausgewertet und Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens $n = 3$ Versuchen verwendet. Zur Kontrolle auf signifikante Unterschiede zwischen Messwerten der Kontrollen und den aufgegebenen Substanzen werden zweiseitig gepaarte t-Test (Student'scher t-Test) mit dem Programm Excel 97 durchgeführt. Dabei wird die Irrtumswahrscheinlichkeit auf $p < 0,05$ festgelegt. Testvoraussetzungen sind normalverteilte Daten, verbundene Messungen, gleiche Varianzen / Standardabweichungen in den Messreihen (mittels f-Test nachweisbar) oder ein annähernd gleicher Stichprobenumfang.

4. Ergebnisse

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humaner Zellen wurden SMC der Ratte, die als Modell für vergleichende Studien der Media-Neointima weit verbreitet sind, für grundsätzliche Tests verwendet. Anschliessend wurden diese Experimente analog in hSMC aus Media und Neointima wiederholt und ein Vergleich der SMC beider Spezies durchgeführt. Die Zellen wurden mit den für die Atherosklerose pharmakologisch relevanten Statinen als auch p53-regulierenden Substanzen behandelt, um ihren Effekt auf die Zellvitalität, Apoptose als auch die Expression von p53 zu untersuchen.

4.1 Untersuchung der rSMC – MTT-Assay und FACS

Die rSMC der Neointima und Media wurden mit verschiedenen Statinen, dem p53- Inhibitor PFT α , dem Anthracyclin-Antibiotikum Doxorubicin und dem p53-Reaktivator PRIMA-1 in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und die Zellzahl mittels MTT-Assay analysiert. Die kolorimetrische Umsetzung des MTT-Substrats durch die mitochondriale Dehydrogenase dient der Messung der Zellvitalität, bei der eine erhöhte Farbstoffmenge auf die Aktivität des Enzyms hindeutet und somit die indirekte Bestimmung der Anzahl wachstumsfähiger Zellen während der Proliferation, Apoptose und Nekrose ermöglicht. Berücksichtigte Parameter sind Zelldichte, Inkubationsdauer und Zellart. Nach den durch diese Versuche erhaltenen Ergebnissen wurde für nachfolgende Versuche für rSMC eine Inkubationsdauer von 24 h und eine Zelldichte von 10000 Zellen / cm² nach 2 Tagen Wachstum in entsprechenden Reaktionsgefäßen verwendet.

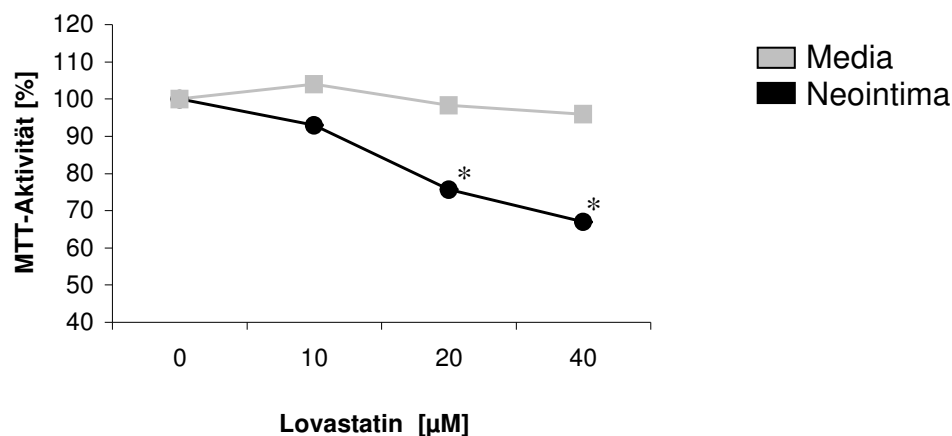


Abb. 25: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin auf rSMC der Neointima und Media

Zellzahl von rSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin (10 bis 40 µM) nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 10000 Zellen / cm²), (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die rSMC der Neointima und Media wurden mit Lovastatinkonzentrationen von 10 bis 40 μM versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24 h Inkubation gemessen (Abb. 25). Media- und Neointima-Zellen der Ratte weisen unterschiedliche Reaktionen auf die Statingabe auf, was im unterschiedlichen Proliferationspotential der Zellen begründet sein kann. Mit zunehmender Lovastatinkonzentration sinkt bei den rSMC der Neointima die Zellzahl, die Media hingegen reagiert nur mit einer geringen Abnahme der Zellzahl, was auf eine höhere Empfindlichkeit exponentiell proliferierender Zellen auf die Statinbehandlung hindeuten könnte.

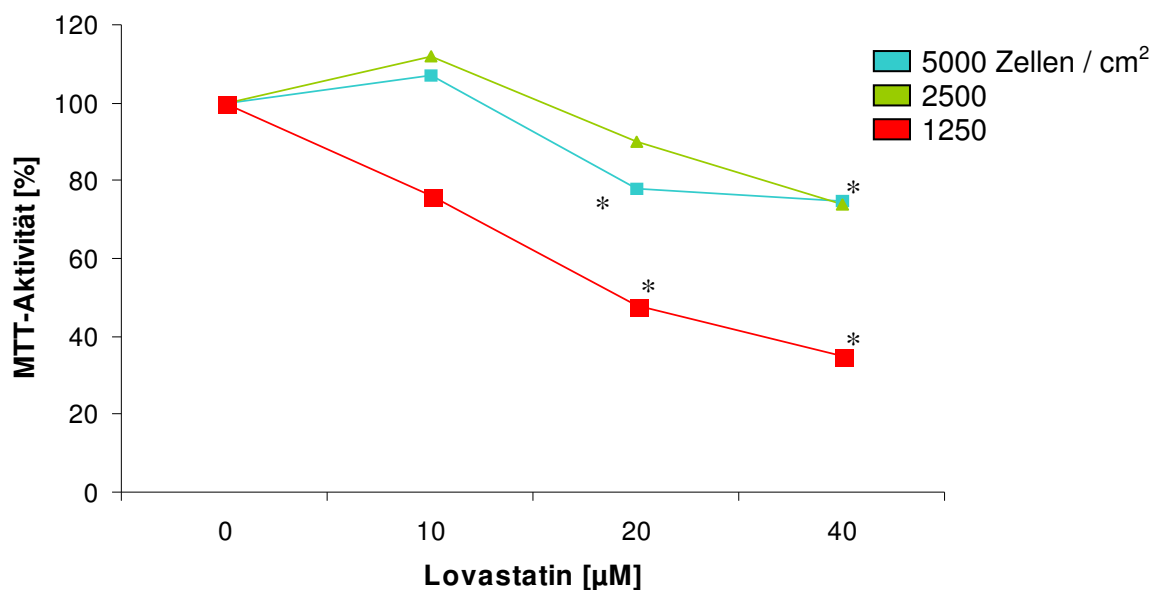


Abb. 26: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin auf rSMC der Neointima

Zellzahl von rSMC der Neointima nach Zugabe von Lovastatin (10 bis 40 μM) nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei verschiedenen Zelldichten (2 Tage Wachstum, 625, 1250, 2500, 5000 Zellen / cm^2) (* $p < 0,05$ versus Kontrolle)

Um unterschiedliche Zelldichten und dadurch möglicherweise anderes Reaktionsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden die rSMC der Neointima mit verschiedenen Zelldichten ausgesät. Jeweils 1250, 2500 und 5000 Zellen / cm^2 wurden mit Lovastatin in Konzentrationen von 10 bis 40 μM für 24 h versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 26). Die rSMC der Neointima zeigen bei Zugabe von Lovastatin eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl. Mit zunehmender Zelldichte reagieren die Zellen weniger auf Lovastatin, was auf einen protektiven Effekt bei hohen Zelldichten hinweist. Für weitere Versuche wurde jedoch eine Zelldichte von 10000 Zellen/ cm^2 ausgewählt (vergl. Abb. 25), da sich der unterschiedliche Effekt der Testsubstanzen bei dieser Dichte deutlicher darstellen ließ und eine Regulation der Apoptose durch unterschiedliche Substanzen möglich war.

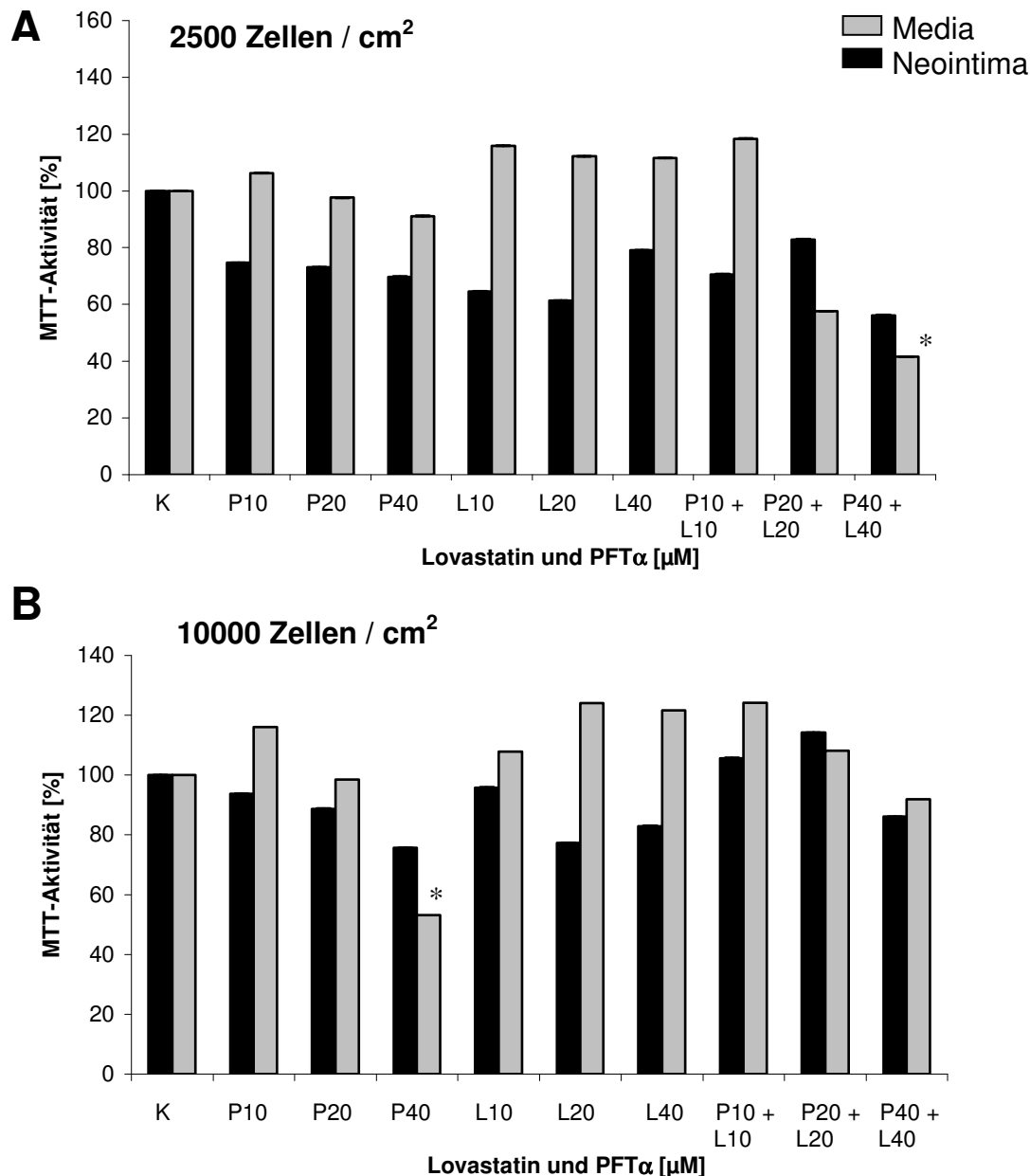


Abb. 27: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin und Pifithrin α auf rSMC der Neointima und Media

Zellzahl von rSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin (L) und PFTα (P) (10 bis 40 μM) nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei einer Zelldichte von 2500 Zellen / cm² (A) und 10000 Zellen / cm² (B) (2 Tage Wachstum) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Bei Zelldichten von 2500 und 10000 Zellen / cm² zeigten Media und Neointima nach Zugabe von Lovastatin als auch PFTα unterschiedliche Reaktionen (Abb. 27 A, B). Bei einer Zelldichte von 2500 Zellen / cm² reagieren die Zellen der Neointima mit einer Reduktion der Zellzahl auf die Testsubstanzen, wohingegen die Zellen der Media nur bei Kombination beider Substanzen eine Reduktion der Zellzahl aufweisen, was auf ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der beiden Zellarten hindeutet (Abb. 27 A). Die Zellen der Neointima reagieren sensibler auf die Testsubstanzen als die Zellen der Media. Bei hohen Zelldichten

reagieren die Zellen weniger, wie bereits gezeigt, weisen aber die unterschiedliche Reaktion der beiden Zellarten auf. Unter Umständen verursacht PFT α bei hohen Zelldichten der Media Apoptose.

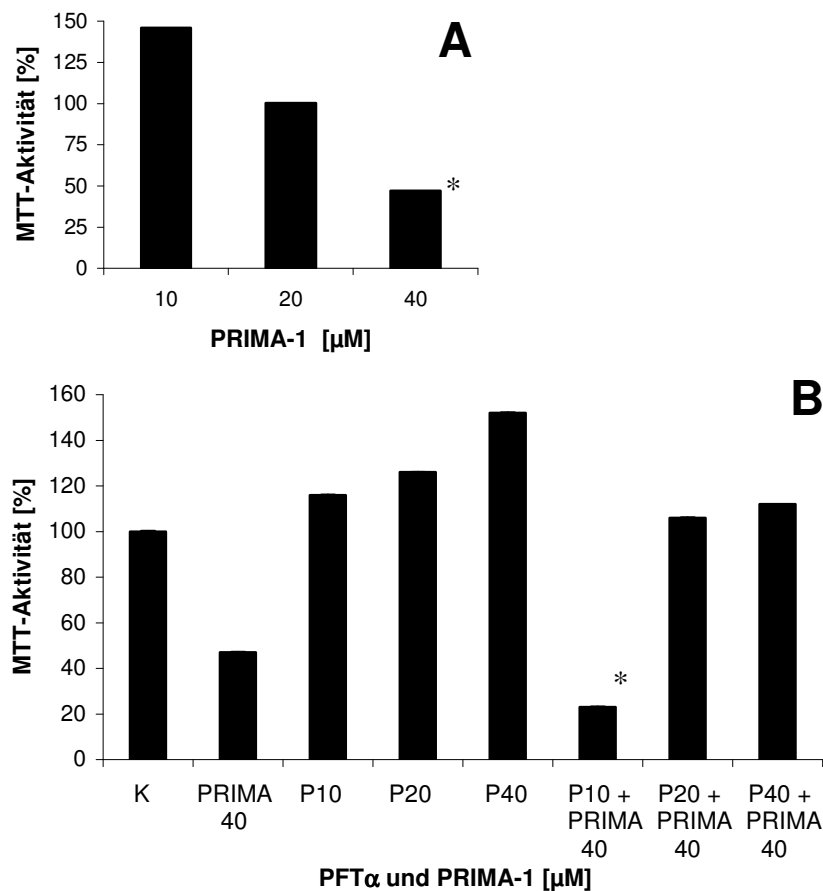


Abb. 28: MTT-Assay: Effekte von PRIMA-1 auf rSMC der Neointima

(A) Zellzahl von rSMC der Neointima nach Zugabe von PRIMA-1 (10 – 40 µM) nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nicht dargestellt: Kontrolle = 100%; 2 Tage Wachstum, 10000 Zellen / cm²), (B) Zellzahl von rSMC der Neointima nach Zugabe von 40 µM PRIMA-1, PFT α (P) (10 – 40 µM) oder einer Kombination beider Substanzen nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nicht dargestellt: Kontrolle = 100%; 2 Tage Wachstum, 10000 Zellen / cm²), (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die rSMC der Neointima wurden mit 10 - 40 µM PRIMA-1 für 24 h versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 28 A). Die Neointima-Zellen zeigen bei einer Zugabe des p53-Reaktivators PRIMA-1 eine bei 10 µM erhöhte Zellzahl, bei 20 µM im Vergleich zu Kontrolle unveränderte Zellzahl und bei 40 µM eine reduzierte Zellzahl. Eine Kombination von PRIMA-1 mit dem p53-Inhibitor PFT α zeigt, dass PFT α den Effekt von 40 µM PRIMA-1 verhindert (Abb. 28 B).

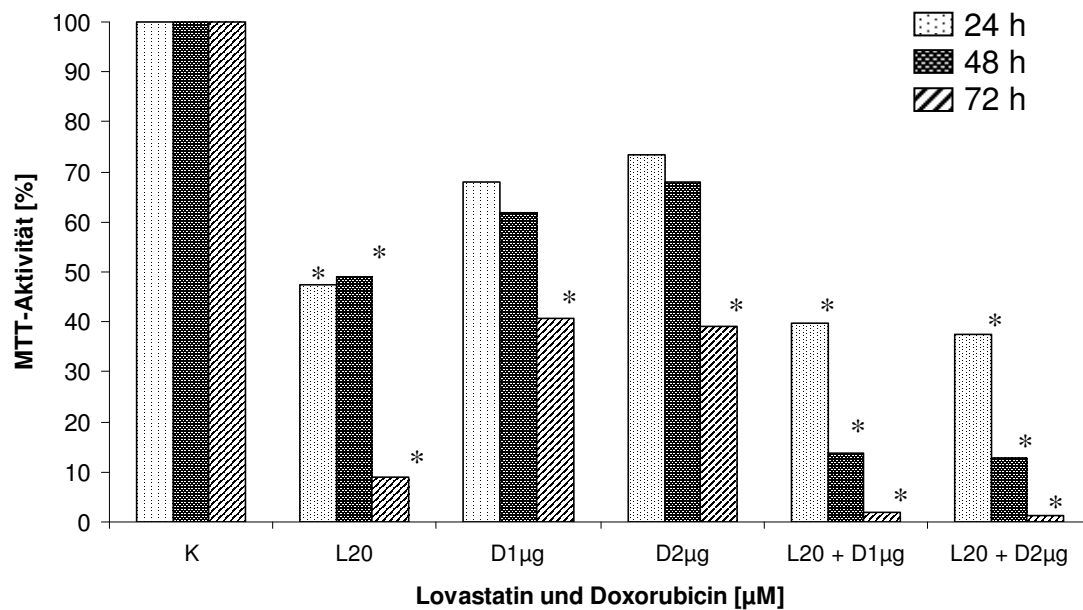


Abb. 29: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin und Doxorubicin auf rSMC der Neointima

Zellzahl von rSMC der Neointima nach Zugabe von 20 µM Lovastatin (L) und Doxorubicin (D) (1 bis 2 µg / ml) nach 24, 48 und 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (nicht dargestellt: Kontrolle = 100 %; 2 Tage Wachstum, 10000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die rSMC der Neointima wurden mit 20 µM Lovastatin und 1 oder 2 µg / ml Doxorubicin für 24, 48 und 72 h versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 29). Die Neointima-Zellen weisen nach Zugabe von Lovastatin eine verringerte Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Doxorubicin, als Positivkontrolle eingesetzt, verursachte ebenfalls eine reduzierte Zellzahl. Die Kombination beider Substanzen verursachte stark verminderte Zellzahlen, was auf eine mögliche Wechselwirkung von Lovastatin und Doxorubicin schliessen lässt. Mit zunehmender Inkubationsdauer verstärkten sich die Effekte auf die Zellzahl. Der Grund für die Verwendung einer Inkubationsdauer von 24 h für die Ratten-Zellen liegt in der verhältnismäßig gut detektierbaren Reaktion der Zellen auf die Testsubstanzen. Bei 48 h ist kein deutlicher Unterschied in der Reaktion der Zellen im Vergleich zu 24 h feststellbar. Nach 72 h Inkubation sind fast alle Zellen tot. Eine Beeinflussung der Apoptose zu diesem Zeitpunkt ist wahrscheinlich nicht möglich.

Zur Untersuchung hinsichtlich möglicher Apoptose wurden die rSMCs mit Lovastatin und dem p53-Inhibitor PFT α versetzt um anschliessend mittels einer Annexin V/PI-Färbung und FACS-Analyse die Anzahl apoptotischer Zellen festzustellen.

Die rSMC der Neointima und Media wurden mit 10 - 40 μ M Lovastatin oder PFT α sowie Kombinationen dieser Substanzen versetzt und die Apoptoseinduktion durch eine Anfärbung mit Annexin V /PI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Des Weiteren wurde parallel die Zellzahl (Trypan-Blau-Test) im Versuchsansatz bestimmt. Die Neointima-Zellen reagieren im Vergleich zur Media mit einer starken Apoptoseinduktion (Ann. V pos./PI neg. Zellen) auf die Lovastatin-Zugabe (Abb. 30 A). PFT α allein erhöht den Anteil Annexin V+/PI-, das heisst, apoptotischer Zellen in der Neointima. Die ausgelöste Apoptose nach kombinierter Zugabe von Lovastatin und PFT α entspricht einer Wirkungssteigerung. Die vermutete protektive Reaktion von PFT α hinsichtlich der Apoptose durch Lovastatin tritt nicht ein.

Entgegen der geringen Reduktion der Zellzahl bei den MTT-Versuchen nach Lovastatin wird hier eine deutliche Reaktion im Sinne einer Induktion der Apoptose ersichtlich. PFT α bewirkt trotz seiner Eigenschaft als p53-Inhibitor eine Induktion der Apoptose, was eventuell durch eine p53-unabhängige Induktion der Apoptose über einen anderen Signalweg zu erklären wäre.

Bei Betrachtung der PI positiven Zellen fallen erhöhte Zellzahlen der Neointima vor allem nach der Gabe von 40 μ M Lovastatin auf (Abb. 30 B). Die Gesamtzellzahl der Neointima sinkt, bei zunehmender Lovastatinkonzentration als auch bei zunehmender PFT α -Menge (Abb. 30 C). Die Kombination der Substanzen zeigt keine Wirkungssteigerung auf die Gesamtzellzahl. Wie beobachtet, wird bei den Media-Zellen eine deutlich geringere Apoptoseinduktion als bei den Neointima-Zellen erkennbar. Die ausgelöste Apoptose nach kombinierter Zugabe von Lovastatin und PFT α entspricht einer Wirkungssteigerung. Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl fällt auf, dass bei zunehmender Lovastatinkonzentration als auch bei zunehmender PFT α -Menge diese nur wenig absinkt. Insgesamt reagieren die Neointima-Zellen mit einer wesentlich stärkeren Apoptoseinduktion als die Zellen der Media.

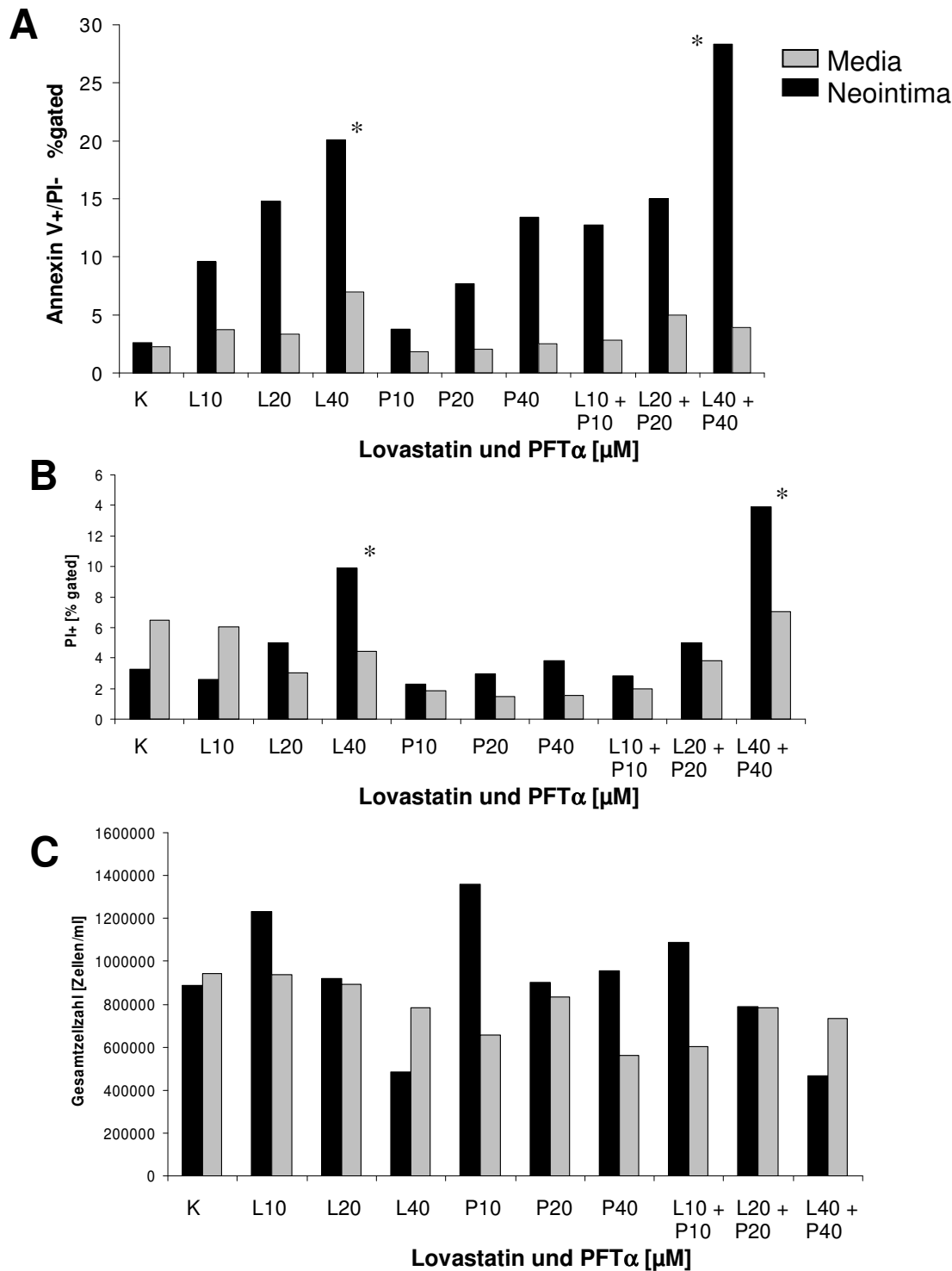


Abb. 30: Apoptose-Assay (FACS-Annexin V/PI) und Zellzahlbestimmung von rSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin und Pifithrin α

FACS-Analyse mit AnnexinV/PI-Färbung von rSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin (L) und PFT α (P) von 10 – 40 μ M nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, dargestellt AnnV+/PI- Zellen (A), PI+ Zellen (B) und Gesamtzellzahl/ml (C) (2 Tage Wachstum, 10000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

4.2 Untersuchung der hSMC – MTT-Assay und FACS

Die hSMC der Neointima und Media wurden mit verschiedenen Statinen, dem p53- Inhibitor PFT α und Doxorubicin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und die Zellzahl mittels MTT-Assay analysiert. Berücksichtigte Parameter waren die Zelldichte, die Inkubationsdauer und die Zellart.

Nach den durch diese Versuche erhaltenen Ergebnissen wurde für nachfolgende Versuche für hSMC eine Inkubationsdauer von 72 h und eine Zelldichte von 5000 Zellen / cm² nach 2 Tagen Wachstum in entsprechenden Reaktionsgefäßen verwendet.

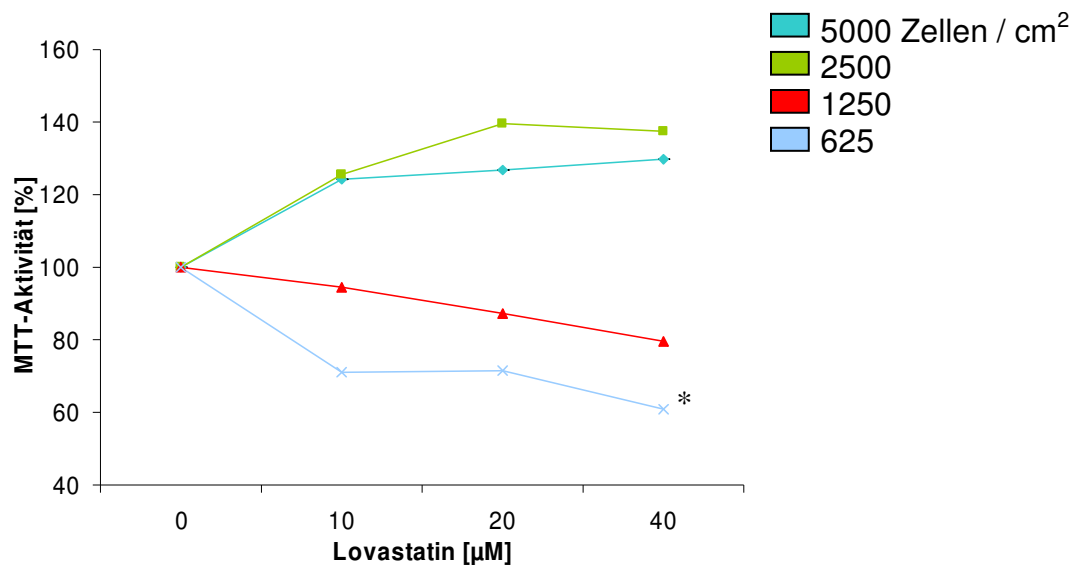


Abb. 31: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin und auf hSMC der Neointima

Zellzahl von hSMC der Neointima nach Zugabe von Lovastatin (10 bis 40 µM) nach 24 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei verschiedenen Zelldichten (2 Tage Wachstum, 625, 1250, 2500, 5000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die hSMC der Neointima wurden bei verschiedenen Zelldichten von 625, 1250, 2500 und 5000 Zellen / cm² mit Lovastatin in Konzentrationen von 10 bis 40 µM für 24 h versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 31). Die Inkubationsdauer ergab sich aus dem Versuchsansatz im direkten Vergleich mit rSMC bei verschiedenen Zelldichten. Die hSMC weisen bei Zugabe von Lovastatin nach einer 24 h stündigen Inkubation eine Abnahme der Zellzahl nur bei extrem niedrigen Zelldichten auf. Zu beobachten war auch hier nur eine relativ geringe Abnahme der Zellzahl nach Lovastatin. Da bei einer Inkubationsdauer von 24 h die Detektion eines Effektes wegen der geringen Zellzahlen schwer war, wurde die Reaktion von hSMC mit Inkubationsdauern von 48 und 72 h auf Lovastatin untersucht.

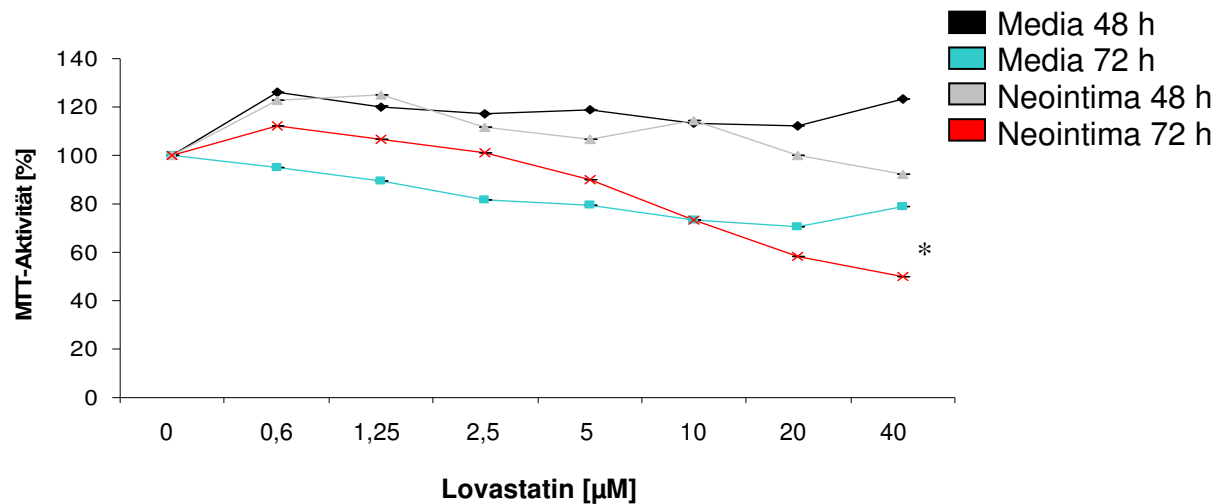


Abb. 32: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin und auf hSMC der Neointima und Media

Zellzahl von hSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin (0,6 bis 40 µM) nach 48 und 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen/cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

hSMC der Neointima und Media wurden bei 48 h und 72 h nach Lovastatinzugabe von 0,6 bis 40 µM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht. Lovastatin zeigt bei längerer Inkubationsdauer einen stärkeren Effekt in humanen Media- und Neointima-Zellen (Abb. 32). Bei beiden Zellarten sinkt mit zunehmender Statinkonzentration die Zellzahl. Ab einer Konzentration von 10 µM Lovastatin bei 72 h Inkubationsdauer ist in hSMC der Neointima eine signifikante Reduktion der Zellzahl zu erkennen. Die Media reagiert weniger sensitiv gegenüber Lovastatin als die Neointima.

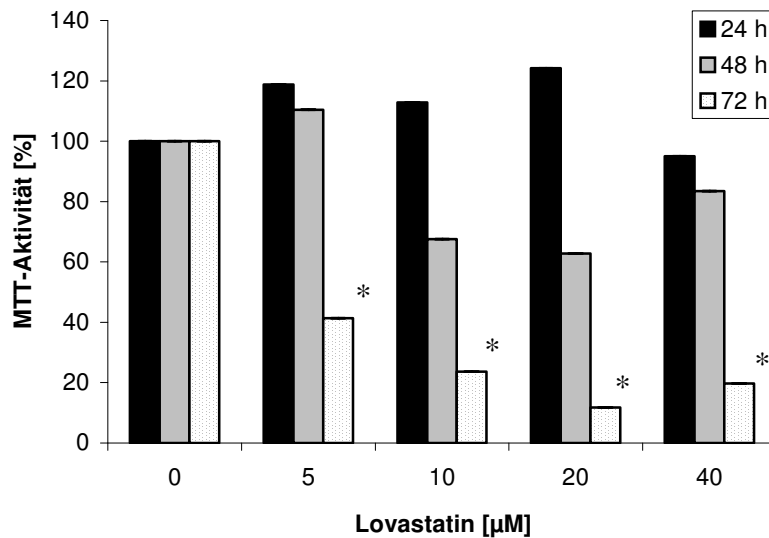


Abb. 33: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin und auf hUA SMC

Zellzahl von hUA SMC nach Zugabe von Lovastatin (5 bis 40 µM) nach 24, 48 und 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen/cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die hUA SMC wurden bei verschiedenen Inkubationsdauern (24, 48, 72 h) und einer Zelldichte von 5000 Zellen / cm² mit Lovastatin (5 bis 40 µM) versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 33). Deutlich wird auch bei den Zellen aus der Nabelschnur, dass eine Erhöhung der Inkubationsdauer den Zellzahl-reduzierenden Effekt von Lovastatin verstärkt. Um so länger Lovastatin auf den Zellen verbleibt, um so stärker ist die Zellzahl reduziert.

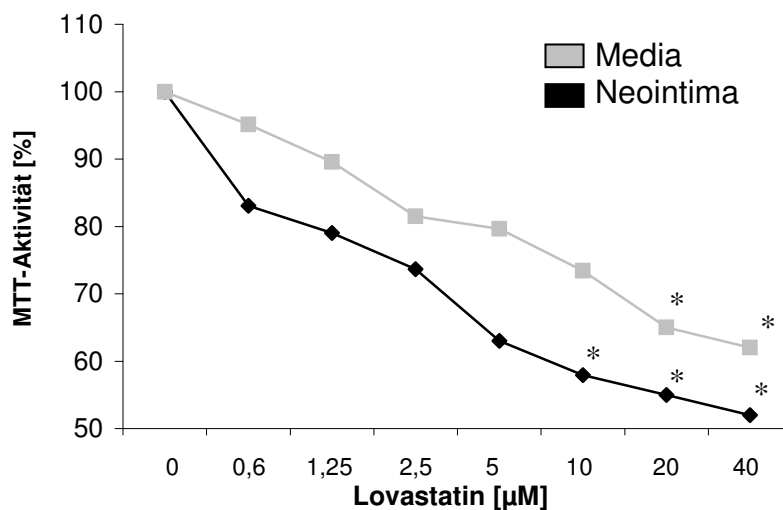


Abb. 34: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin und auf hSMC der Neointima und Media

Zellzahl von hSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin (0,6 bis 40 µM) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100 %, 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die hSMC der Neointima und Media wurden mit Lovastatinkonzentrationen von 0,6 bis 40 μM versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 34). Media und Neointima-Zellen zeigen unterschiedliche Reaktionen auf die Statinzugabe. Bei beiden Zellarten sinkt mit zunehmender Statinkonzentration die Zellzahl. Ab 5 μM Lovastatin ist eine signifikante Reduktion der Zellzahl zu erkennen. Media-Zellen reagieren weniger sensitiv gegenüber Lovastatin als Zellen der Neointima.

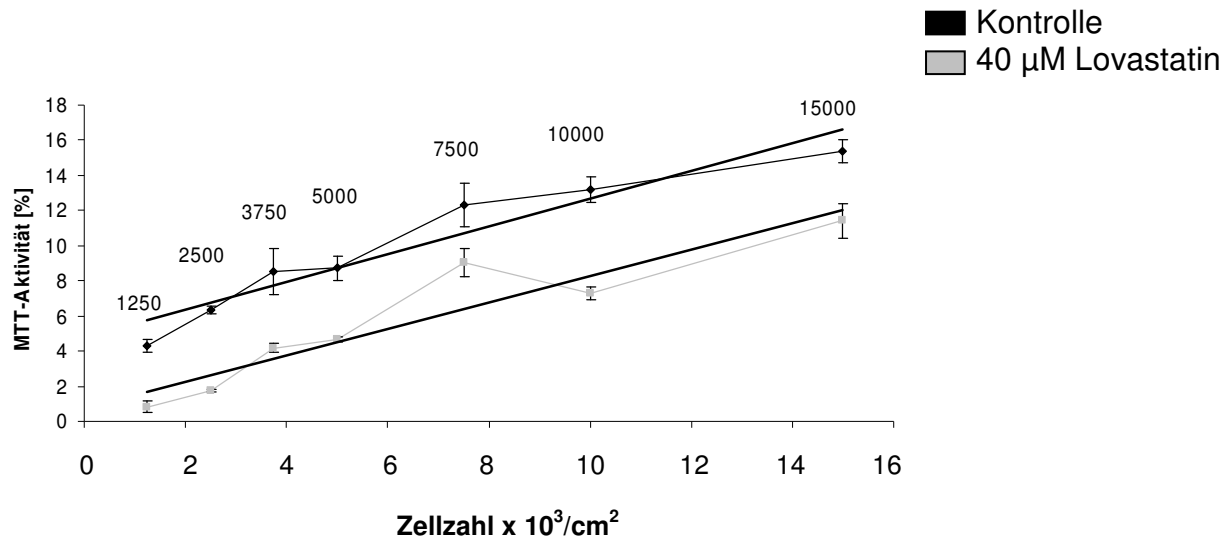


Abb. 35: MTT-Assay: Effekte von Lovastatin auf hSMC der Neointima

Zellzahl von hSMC der Neointima in unterschiedlichen Zelldichten (1250, 2500, 3750, 5000, 7500, 10000 und 15000 Zellen / cm^2) nach Zugabe von 40 μM Lovastatin nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum)

Da sich aus den vorangegangenen Versuchen eine zelldichteabhängige Apoptosesensitivität abgezeichnet hatte, wurde der Einfluß von Lovastatin bei verschiedenen Zelldichten getestet. hSMC der Neointima wurden mit 1250, 2500, 3750, 5000, 7500, 10000 und 15000 Zellen / cm^2 ausgesät, mit 40 μM Lovastatin versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 72 h gemessen (Abb. 35). In dem untersuchten Zelldichtebereich nimmt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase sowohl in der Kontrolle als auch bei den mit 40 μM Lovastatin behandelten Zellen mit zunehmender Zelldichte zu. Eine signifikante Reduktion der Zellzahl nach Zugabe von 40 μM Lovastatin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist für alle getesteten Zelldichten erkennbar. Der parallele Verlauf der Ausgleichsgeraden für beide Bedingungen deutet darauf hin, dass über den gesamten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem Lovastatin-Effekt besteht.

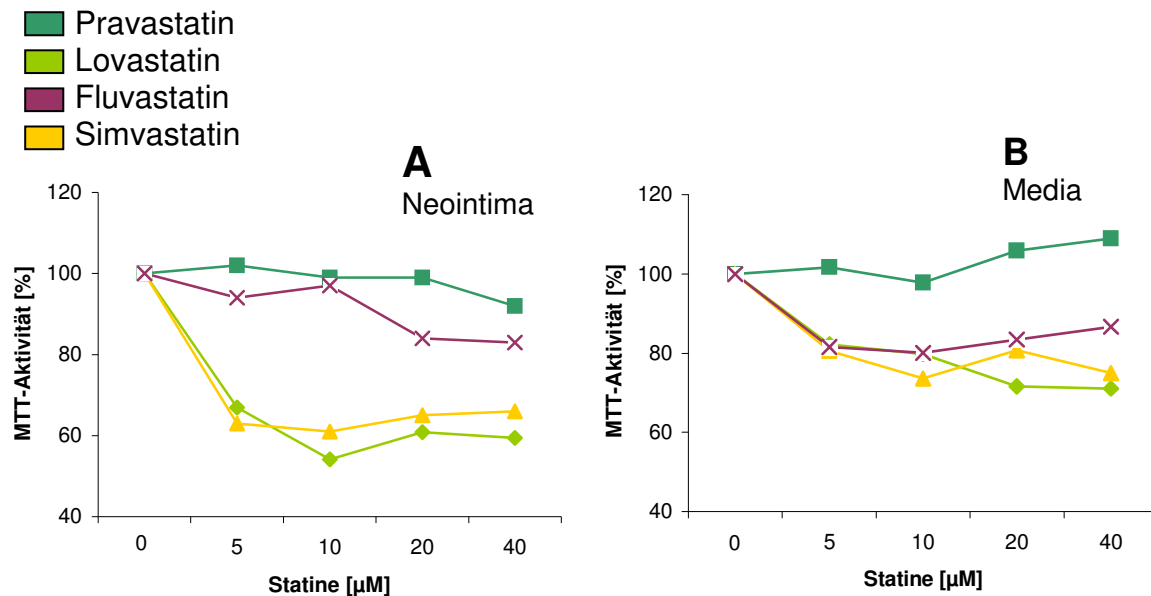


Abb. 36: MTT-Assay: Effekte von Statinen auf hSMC

(A) Zellzahl von hSMC der Neointima nach Zugabe von Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin und Fluvastatin (5 bis 40 µM) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (B) Zellzahl von hSMC der Media nach Zugabe von Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin und Fluvastatin (5 bis 40 µM) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Der Effekt verschiedener Statine wurde in hSMC der Neointima (Abb. 36 A) und Media (Abb. 36 B) untersucht. Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin und Fluvastatin in Konzentrationen von 5 bis 40 µM wurden zugesetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Beide Zellarten weisen abnehmende Zellzahlen nach Statinzugabe auf. Lovastatin und Fluvastatin verursachen dabei die größte Reduktion der Zellzahl, wohingegen Simvastatin in Media und Neointima nur eine leichte Reduktion der Zellzahl verursacht. Pravastatin reduziert die Zellzahl der Neointima nur bei 40 µM geringfügig. Zellen der Media zeigen unter Einwirkung von Pravastatin eine leichte Erhöhung der Zellzahl.

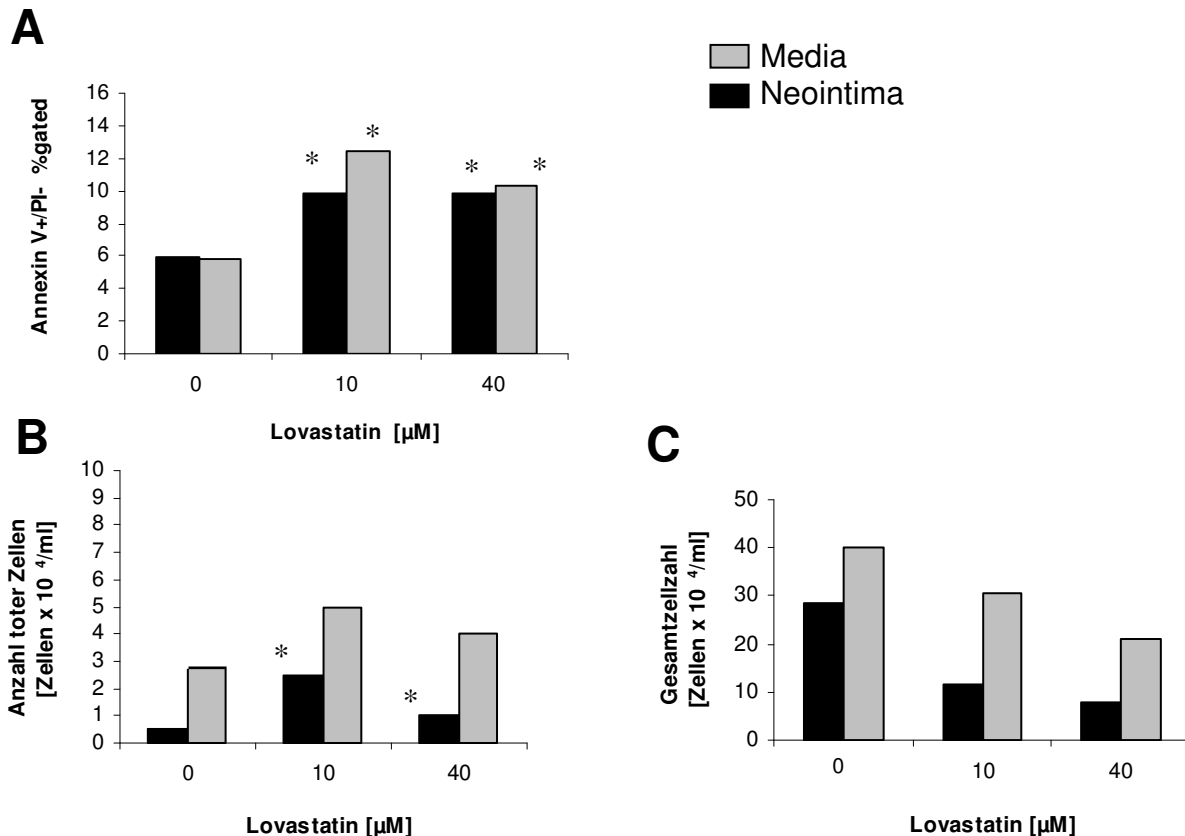


Abb. 37: Apoptose-Assay (FACS-Annexin V/PI) und Zellzahlbestimmung von hSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin

FACS-Analyse mit AnnexinV/PI-Färbung von hSMC der Neointima und Media nach Zugabe von Lovastatin (10 – 40 µM) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²), dargestellt AnnV+/PI- Zellen (A), Gesamtzellzahl/ml (B) und Anzahl toter Zellen/ml (D)

(*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die hSMC der Neointima und Media wurden mit 10 - 40 µM Lovastatin versetzt und die Apoptoseinduktion durch eine Anfärbung mit Annexin V /PI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (Abb. 37 A). Des Weiteren wurde parallel sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl lebender Zellen im Versuchsansatz bestimmt (Abb. 37 B,C). Die Neointima- als auch Media-Zellen reagieren mit Apoptoseinduktion auf die Lovastatingabe.

Im Gegensatz zu rSMC zeigen die hSMC ein anderes Verhalten der Media und Neointima bei der Apoptosemessung. Zellen der Media und Neointima reagieren in etwa gleich mit einer Erhöhung der Annexin V-positiven Zellen. Die parallel dazu ausgeführte Zellzählung zeigt, dass die Gesamtzellzahl mit zunehmender Statinkonzentration sinkt. Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl wird bei den Zellen der Neointima nach Zugabe von 10 µM Lovastatin eine Reduktion um 60 % und nach 40 µM Lovastatin um 72 % erkennbar. Die Zellen der Media hingegen weisen bei 10 µM Lovastatin nur eine Abnahme um 24% und bei 40µM Lovastatin um 47 % auf. Die Anzahl toter Zellen im Versuchsansatz zeigt eine starke Zunahme bei

10 μ M Lovastatin. Bei Konzentrationen über 10 μ M Lovastatin könnten Zellen möglicherweise aufgelöst und damit nicht mehr anfärbbar sein.

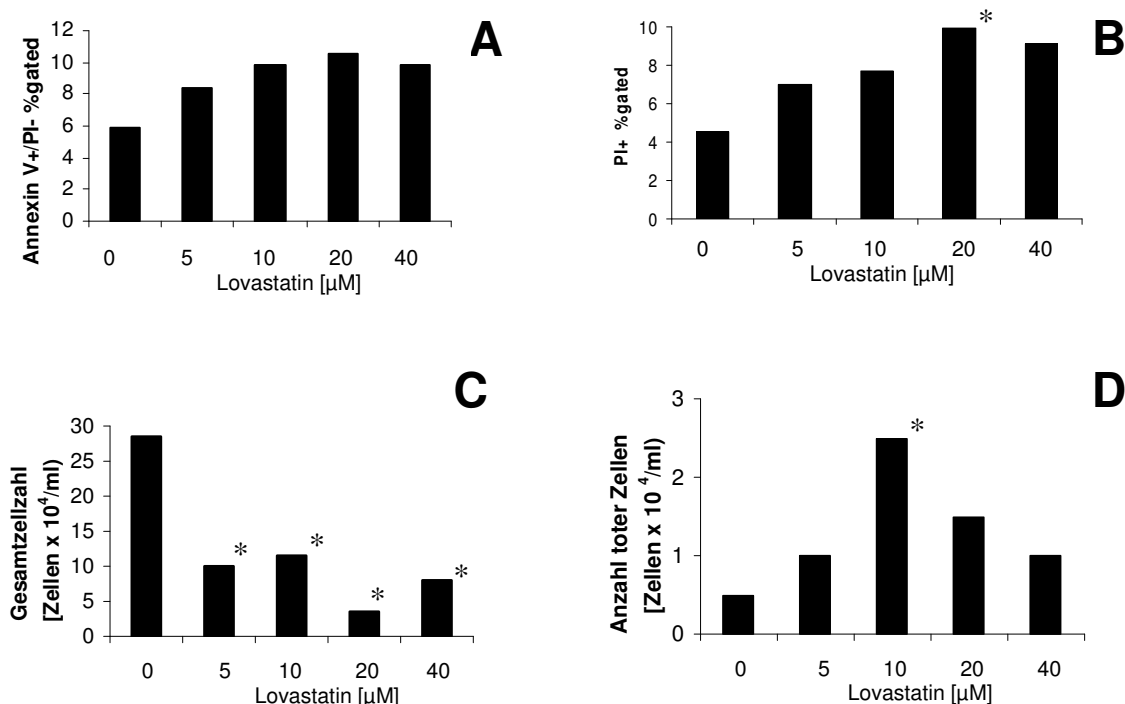


Abb. 38: Apoptose-Assay (FACS-Annexin V/PI) und Zellzahlbestimmung von hSMC der Neointima nach Zugabe von Lovastatin

FACS-Analyse mit AnnexinV/PI-Färbung von hSMC der Neointima nach Zugabe von Lovastatin (5 – 40 μ M) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2), dargestellt AnnV+/PI- Zellen (A), PI+ Zellen (B), Gesamtzellzahl/ml (C) und Anzahl toter Zellen/ml (D) (* $p < 0,05$ versus Kontrolle)

Die hSMC der Neointima wurden mit 5 - 40 μ M Lovastatin versetzt und die Apoptoseinduktion durch Annexin V /PI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Des Weiteren wurde parallel die Gesamtzellzahl als auch die Zellzahl toter Zellen bestimmt. Die Neointima-Zellen reagieren mit einer konzentrationsabhängigen Apoptoseinduktion auf Lovastatin (Abb. 38 A). Die Anzahl der toten Zellen (PI+) nimmt ebenfalls konzentrationsabhängig zu (Abb. 38 B). Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl kann eine signifikante Reduktion der Zellzahl beobachtet werden. Durch die Zugabe von Lovastatin wird die Zellzahl stark reduziert und die noch verbleibenden Zellen reagieren sowohl mit Apoptose als auch sekundärer Nekrose. Die Anzahl toter Zellen im Versuchsansatz zeigt eine starke Zunahme bei 10 μ M Lovastatin. Bei Konzentrationen über 10 μ M Lovastatin könnten Zellen wegen der langen Inkubationsdauer von 72 h möglicherweise aufgelöst und damit nicht mehr anfärbbar sein.

4.3 Western Blot

4.3.1 Vorversuche in L87-Zellen

In initialen Experimenten hatte sich gezeigt, dass SMC unter Standardkulturbedingungen relativ niedrige Spiegel an p53 exprimieren. Aus diesem Grund wurde die mesenchymale Zelllinie L87 eingesetzt, da diese vermutlich wegen ihrer Immortalisierung eine hohe p53-Expression zeigt. Die immortalen Zellen können theoretisch zu SMC differenzieren. Die Detektion von basalem p53 und phosphoryliertem p53 durch Western Blot wurde an L87-Zellen optimiert und später auf hSMC und rSMC übertragen. Alle an SMC getesteten Substanzen wurden auch in L87-Zellen untersucht. Für nachfolgende Versuche wurde eine Inkubationsdauer von 72 h und eine Zelldichte von 5000 Zellen / cm² nach 2 Tagen Wachstum in entsprechenden Reaktionsgefäßen verwendet.

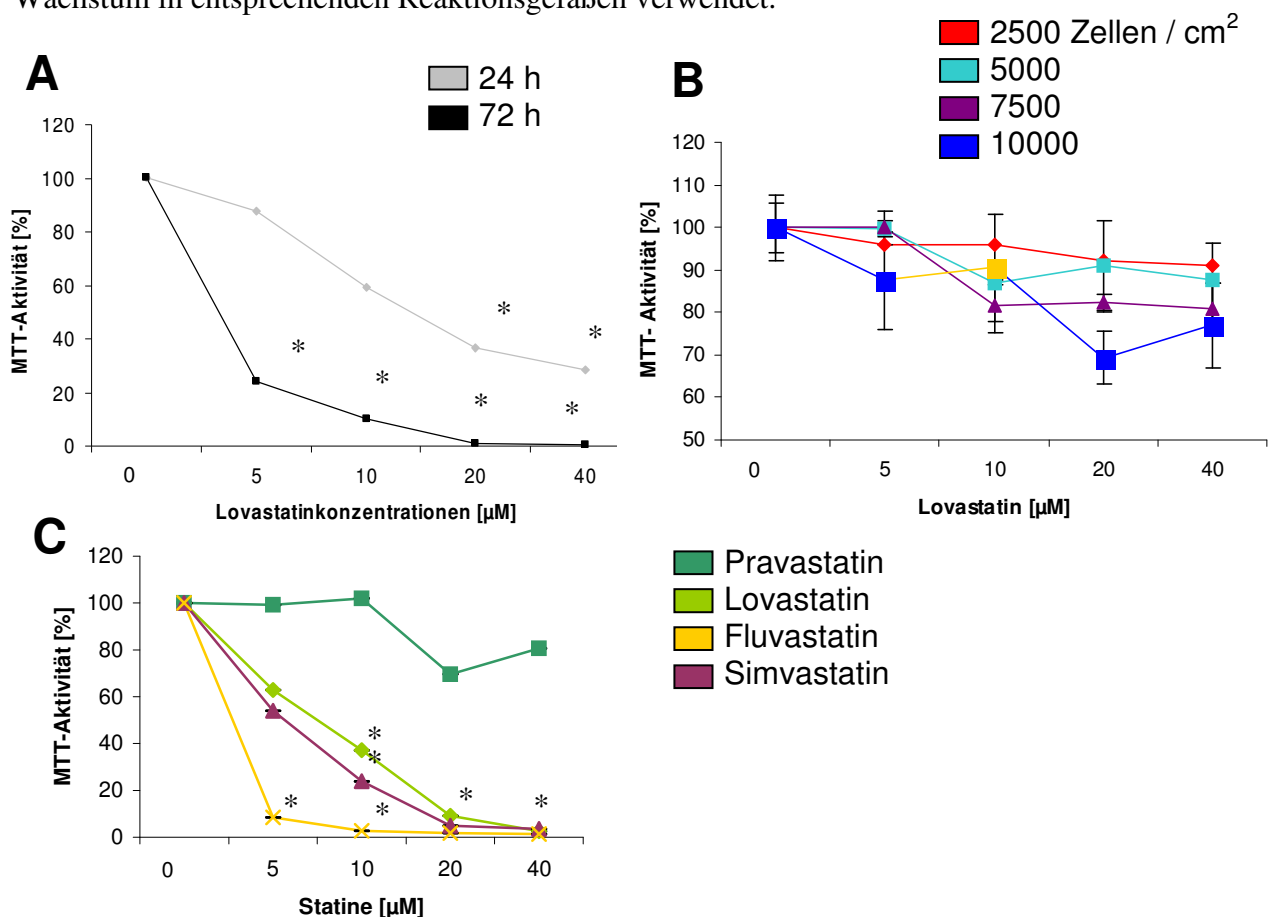


Abb. 39: MTT-Assay: Effekte von Statinen auf L87-Zellen

Zellzahl von L87 nach Zugabe von Lovastatin (5 bis 40 µM) nach 24 und 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (A) (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²); Zellzahl von L87 nach Zugabe Lovastatin (von 5 bis 40 µM) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei unterschiedlichen Zelldichten (2500, 5000, 7500 und 10000 Zellen / cm², 2 Tage Wachstum) (B); Zellzahl von L87 nach Zugabe von Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin und Fluvastatin (5 bis 40 µM) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (C) (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

L87-Zellen wurden bei einer Dichte von 5000 Zellen / cm² mit Lovastatinkonzentrationen von 5 bis 40 µM für 24 h und 72 h versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abb. 39 A). Bei beiden Inkubationsdauern nimmt die Zellzahl mit zunehmender Lovastatinkonzentration ab.

Beim Einsatz verschiedener Zelldichten und Lovastatinkonzentrationen von 5 bis 40 µM nimmt die Zahl der L87-Zellen konzentrationsabhängig ab (Abb. 39 B). Dabei wird deutlich, dass die immortale Zelllinie, nicht wie primäre Zellen bei hohen Zellkonzentrationen unanfälliger für Lovastatin ist. Im Fall der L87 reagieren die Zellen bei hohen Dichten besonders sensitiv. Durch ihre Eigenschaft als Zelllinie zeigen die L87 kein typisches Bild wie die primären Zellen.

Verschiedene Statine wurden vergleichend in den L87-Zellen untersucht. L87-Zellen wurden dazu bei einer Dichte von 5000 Zellen / cm² mit Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin und Fluvastatin in Konzentrationen von 5 bis 40 µM versetzt und die MTT-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Bei allen Statinen nimmt mit zunehmenden Konzentrationen die Zellzahl ab. Fluvastatin verursacht dabei die größte Reduktion der Zellzahl, wohingegen Pravastatin nur eine leichte Reduktion der Zellzahl bewirkt.

L87 Zellen wurden mit 10 - 40 µM Lovastatin, 2 µg/ml Doxorubicin, 20 µM PFTα und Kombinationen versetzt, und eine mögliche Apoptoseinduktion wurde durch eine Anfärbung mit Annexin V /PI im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Des Weiteren wurde parallel die Anzahl toter Zellen im Versuchsansatz bestimmt. PFTα, Lovastatin und Doxorubicin verursachen Apoptose in den L87-Zellen (Abb. 40 A). PFTα erzeugt bei alleiniger Zugabe Apoptose, reduziert aber bei gleichzeitiger Gabe mit Lovastatin die Statinwirkung. Es wird deutlich, dass L87-Zellen auf eine Behandlung mit Doxorubicin mit einer hohen Anzahl Annexin V-positiver Zellen reagieren. Eine gleichzeitige Gabe von PFTα reduziert diese Wirkung nicht. Angefärbte tote Zellen (PI positiv) treten nach Zugabe von Lovastatin, Doxorubicin und Kombinationen mit PFTα auf (Abb. 40 B). Bei Betrachtung der Messwerte der mit Trypan-Blau gefärbten toten Zellen ist bei Zugabe von Doxorubicin eine signifikante Erhöhung an toten Zellen zu erkennen, welche durch gleichzeitige Gabe von PFTα leicht reduziert wird (Abb. 40 C).

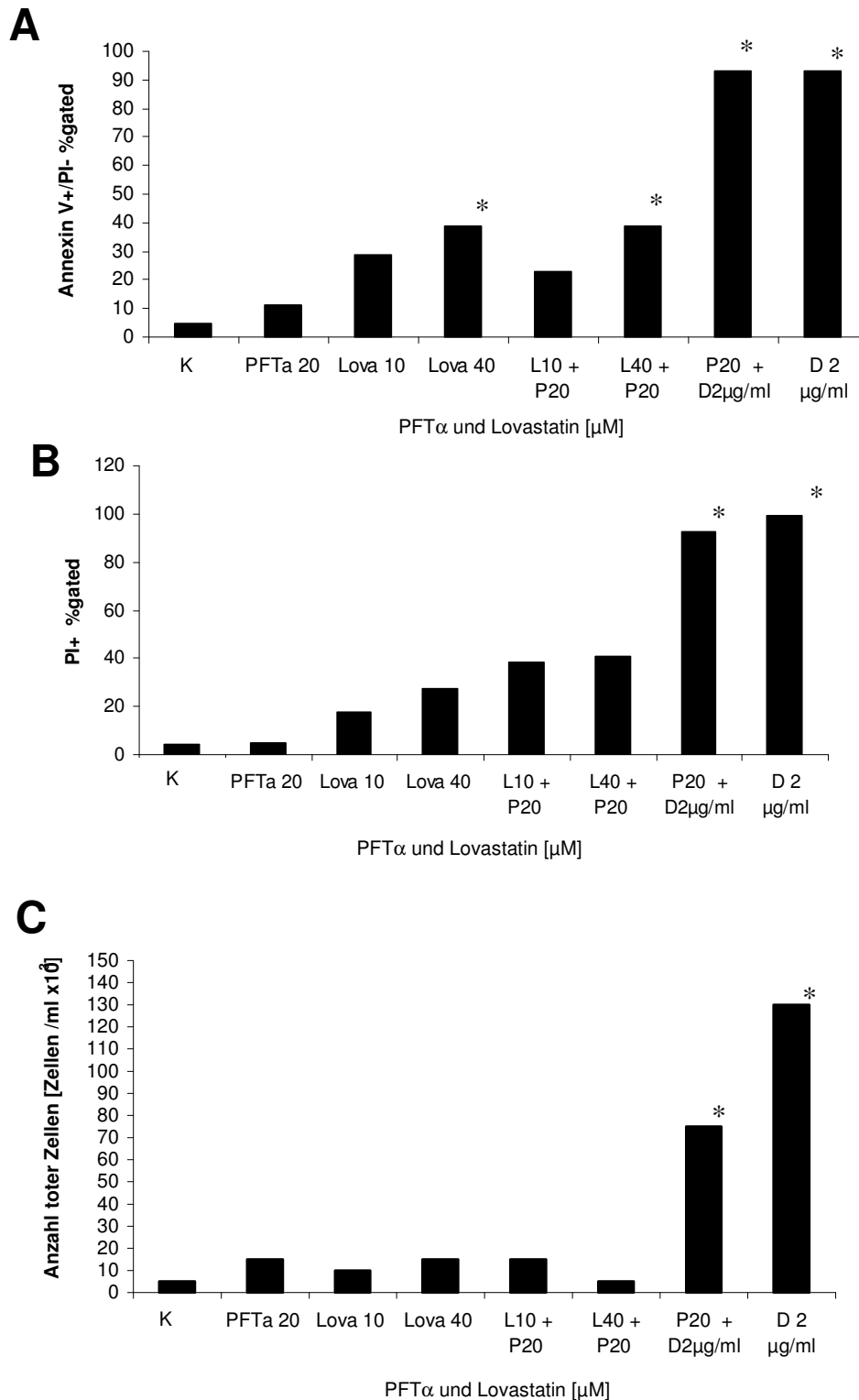


Abb. 40: Apoptose-Assay in L87-Zellen

Apoptose-Assay (FACS-Annexin V/PI) und Bestimmung der Anzahl toter Zellen von L87 nach Zugabe von 10 – 40 μM Lovastatin (L, Lova), 20 μM PFTα (P) und 2 μg/ml Doxorubicin (D) nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²), dargestellt AnnV+/PI- Zellen (A), PI+ Zellen (B) und Anzahl toter Zellen/ml (C) (2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

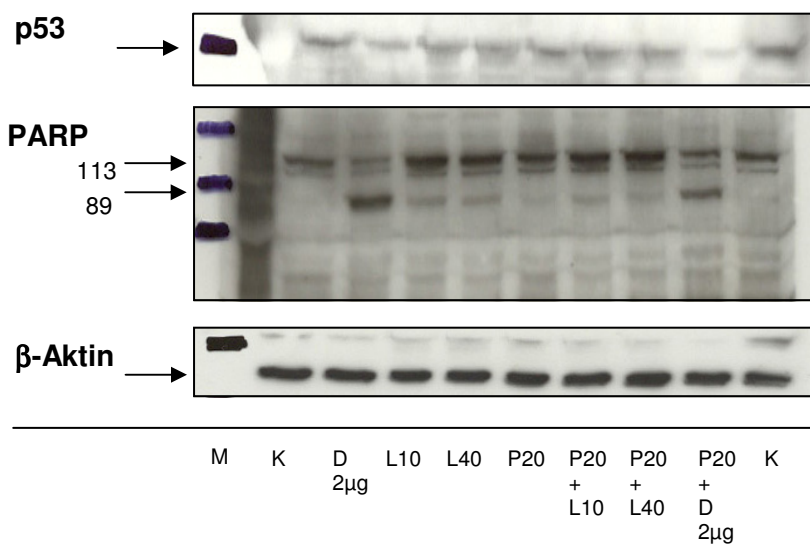


Abb. 41: Western-Blot in L87-Zellen

Proteinexpressionsanalyse von L87-Zellen nach Zugabe von 10 und 40 µM Lovastatin (L) sowie 20 µM PFTα (P) und 2 µg/ml Doxorubicin (D); 72 h Inkubation, Detektion mit Antikörpern gegen p53; PARP und β-Aktin (M = Marker, K = unbehandelte Kontrolle; 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm²)

L87 Zellen wurden mit 10 - 40 µM Lovastatin, 2 µg/ml Doxorubicin, 20 µM PFTα und Kombinationen versetzt und die Expression von p53, PARP und β-Aktin mittels Western Blot analysiert (Abb. 41). Die immortalen Zellen weisen nach Doxorubicin-Stimulation ein deutlich gespaltenes PARP-Protein (89 kDa Fragment) auf. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit PFTα wird eine im Vergleich zur Doxorubicin abgeschwächte Spaltung des PARP-Proteins erkennbar, was durch eine hemmende Wirkung des PFTα auf p53 und damit gehemmte Apoptose zu erklären ist. Doxorubicin induzierte Apoptose wird über den p53-Signalweg vermittelt.

Die Gabe von Lovastatin bewirkt nur eine schwache Spaltung des PARP-Proteins, was auf eine schwache Apoptose schließen lässt. Bei gleichzeitiger Inkubation mit PFTα ist eine reduzierte PARP-Spaltung erkennbar. Bei Betrachtung der p53-Expression wird deutlich, dass Doxorubicin und auch die Kombination von Doxorubicin und PFTα eine verminderte Expression verursachen, was unter Umständen durch eine Degradation des Proteins hervorgerufen wird. Lovastatin zeigt keine Wirkung auf die p53-Expression, was zu der Vermutung führt, dass Lovastatin zwar Apoptose induzieren kann, aber nicht über den p53-Signalweg agiert.

4.3.2 Expression und Regulation von p53 in SMC

Um Rückschlüsse auf die Aktivierung des p53 durch die verwendeten Testsubstanzen in SMC zu ziehen, wurde die Expression von p53, P-p53 (Ser15), PARP und β -Aktin betrachtet.

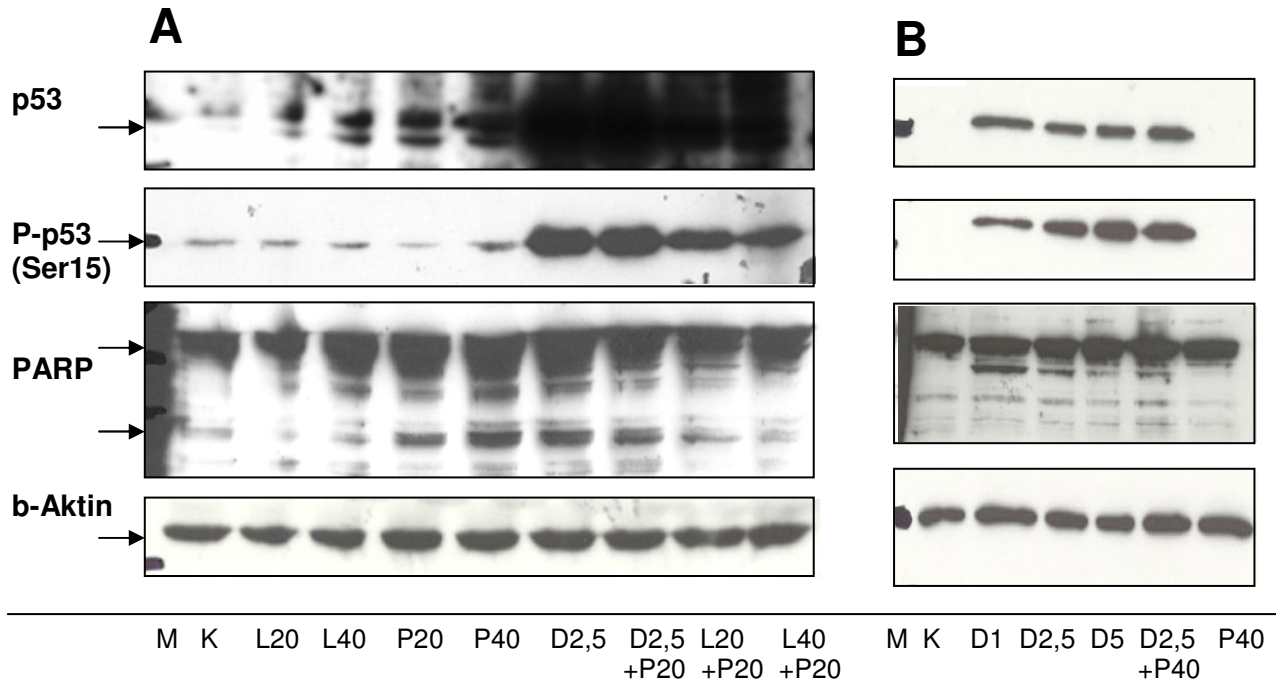


Abb. 42: Western-Blot von rSMC der Neointima

Proteinexpressionsanalyse von rSMC der Neointima nach Zugabe von 1 - 5 μ g / ml Doxorubicin (D), 20 – 40 μ M PFT α (P), 20 – 40 μ M Lovastatin (L) und Kombinationen nach 24 h Inkubation, Detektion mit Antikörpern gegen p53, P-p53(Ser15), PARP und β -Aktin; (M = Marker, K = unbehandelte Kontrolle; 2 Tage Wachstum, 10000 Zellen / cm^2) (A) + (B) zwei parallele Versuchsansätze

Die rSMC der Neointima wurden mit 2,5 μ g / ml Doxorubicin, 20 – 40 μ M PFT α , 20 – 40 μ M Lovastatin und Kombinationen versetzt und die Expression von p53, P-p53 (Ser15), PARP und β -Aktin mittels Western Blot analysiert (Abb. 42). Bei Betrachtung der PARP-Expression wird eine Spaltung des Proteins nach Doxorubicin deutlich. p53 weist unter Doxorubicin eine deutliche Phosphorylierung an Serin 15 auf, was auf die Aktivierung des p53 hinweist. Bei Betrachtung des p53 wird ebenfalls eine gesteigerte Expression nach Gabe von Doxorubicin erkennbar. Die Kombination von Doxorubicin mit PFT α verursacht im Fall des p53 als auch der phosphorylierten Form keine Abschwächung der Expression. Lovastatin verursacht auch bei den Zellen der Ratte keine erhöhte Expression des p53 oder seiner phosphorylierten Form. In Kombination von Lovastatin mit PFT α ist jedoch eine erhöhte Expression von p53 erkennbar sowie eine Phosphorylierung an Serin 15.

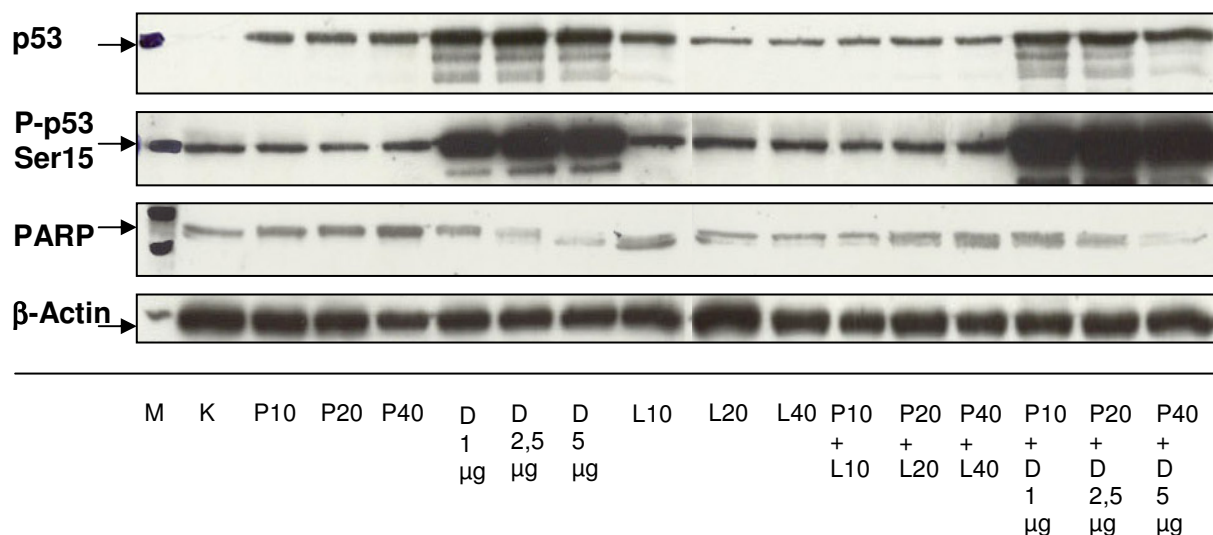


Abb. 43: Western-Blot von hSMC der Neointima

Proteinexpressionsanalyse von hSMC der Neointima nach Zugabe von 10 - 40 μ M Lovastatin (L), 10 - 40 μ M PFT α (P) und 1 - 5 μ g/ml Doxorubicin (D); 72 h Inkubation, Detektion mit Antikörpern gegen p53, P-p53(Ser15), PARP und β -Aktin; (M = Marker, K = unbehandelte Kontrolle; 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2)

Die hSMC der Neointima wurden mit 10 - 40 μ M Lovastatin, 10 - 40 μ M PFT α , 1 - 5 μ g/ml Doxorubicin und Kombinationen versetzt und die Expression von p53, P-p53 (Ser15), PARP und β -Aktin mittels Western Blot analysiert (Abb. 43). Bei Betrachtung der PARP-Expression wird eine konzentrationsabhängige Spaltung des Proteins (Bande bei 89 kDa) nach Gabe von Doxorubicin deutlich, die nur schwach durch eine gleichzeitige PFT α -Gabe reduziert werden kann. Lovastatin hingegen verursacht nur bei hohen Dosen eine Spaltung des PARP-Proteins. Doxorubicin verursacht eine gesteigerte Expression des p53, was ein deutliches Indiz der Wirkung von Doxorubicin auf das p53 ist. p53 weist nach Doxorubicingabe und der Kombination mit PFT α eine deutliche Phosphorylierung an Serin 15 auf, was ein Zeichen der Aktivierung des p53 ist. Lovastatin verursacht keine Phosphorylierung des p53 und steigert auch die Expression des p53 nicht.

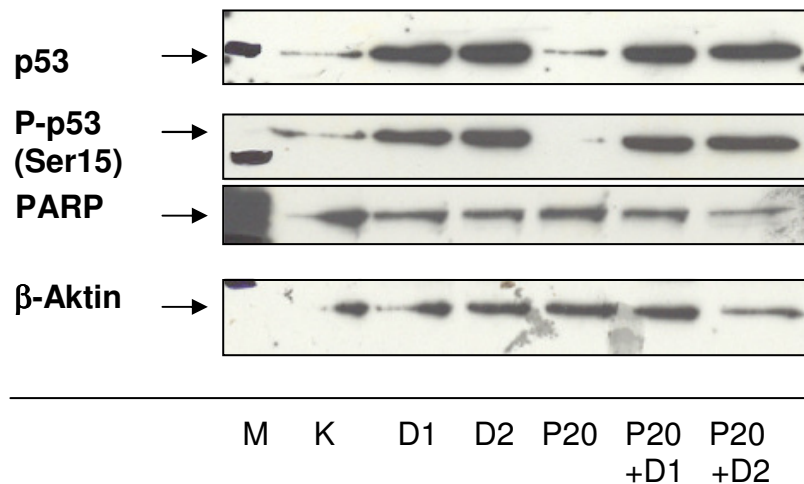


Abb. 44: Western-Blot von hSMC der Media

Proteinexpressionsanalyse von hSMC der Media nach Zugabe von 1 und 2 μg Doxorubicin (D), 20 μM PFT α (P) und Kombinationen nach 72 h Inkubation, Detektion mit Antikörpern gegen p53, P-p53(Ser15), PARP und β -Aktin; (M = Marker, K = unbehandelte Kontrolle; 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2)

Die hSMC der Media wurden mit 1 und 2 μg Doxorubicin, 20 μM PFT α und Kombinationen versetzt und die Expression von p53, P-p53 (Ser15), PARP und β -Aktin mittels Western Blot analysiert (Abb. 44). Bei Betrachtung der PARP-Expression wird eine geringe Spaltung des Proteins nach Gabe von Doxorubicin erkennbar, p53 wird durch Doxorubicin deutlich an Serin 15 phosphoryliert. Bei Betrachtung des p53 wird eine gesteigerte Expression nach Doxorubicin erkennbar. Die Kombination von Doxorubicin mit PFT α verursacht im Fall des p53 als auch seiner phosphorylierten Form eine geringe Abschwächung der Expression, was durch eine p53-hemmende Wirkung zu erklären ist.

4.4 siRNA in hSMC der Neointima

4.4.1 Transfektion von siRNA in hSMC der Neointima - Magnetofektion

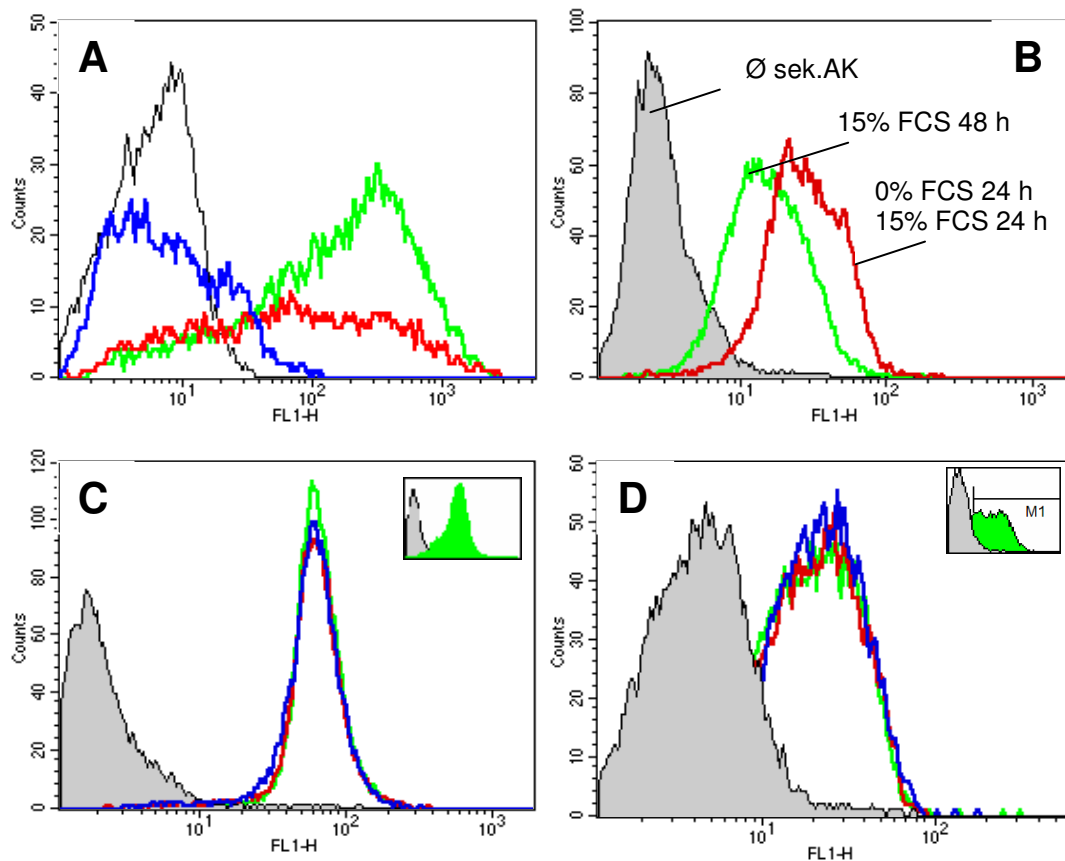


Abb. 45: Magnetofektion –FACS-Analyse

(A) Kinetik der Transfektionseffizienz von siRNA in hSMC der Neointima; Kontrolle = nur MATra-Reagenz (grau), Alexa 488 siRNA 24 h post Transfektion (grün), siRNA 48 h post Transfektion (rot), siRNA 72 h post Transfektion (blau)

(B) Antikörperkontrolle der p53 AK in hUA SMC unter Einwirkung von Serumangel; p53 Expression (Cell signalling p53 AK) in 15% FCS 48 h (grün) und 0% FCS 24h + 15% FCS 24 h (rot), Kontrolle = nur sekundärer AK (grau),

(C) Effekt der 1-fach Transfektion (24 h) von hUA SMC mit 2 verschiedenen siRNA-Konstrukten; Kontrolle = nur sekundärer AK (grau), Kontrolltransfektion (Cell signalling p53 AK) (grün); 24 h Transfektion von p53 siRNA (Ambion rot + Quiagen blau)

Rechts oben: Kontrolle MATra (grau) Alexa488 siRNA (grün); Transfektionsrate (96%)

(D) Effekt der 3-fach Transfektion (3 x 24 h) von hSMC der Neointima mit drei verschiedenen siRNA-Konstrukten; Kontrolltransfektion (Cell signalling p53 AK) (grün), p53 siRNA (Ambion rot + Quiagen blau),

Rechts oben: Kontrolle 3x 24h MATra (grau) 3 x Alexa 488 siRNA (grün), Transfektionsrate (77%)

Wie deutlich erkennbar, ist eine Kinetik der Transfektionseffizienz zu detektieren. Die Transfektionseffizienz nimmt mit zunehmender Kulturdauer der Zellen ab (Abb. 45 A). Die paradoxe Hochregulation von p53 nach Serumzugabe zeigt je nach Serumkonzentration

unterschiedliche p53-Spiegel (Abb. 45 B). Eine Transfektion der Zellen bewirkt keine Reduktion des p53-Spiegels im Vergleich zur Kontrolltransfektion. Der gewünschte *knockdown* des p53 ist nicht erfolgt. Eine daraufhin durchgeführte 3-fach Transfektion zeigte ebenfalls keine Effekte der siRNA auf die p53 Proteinexpression und war somit ebenfalls erfolglos.

4.4.2 Transduktion von siRNA in hSMC der Neointima – Effizienzanalyse

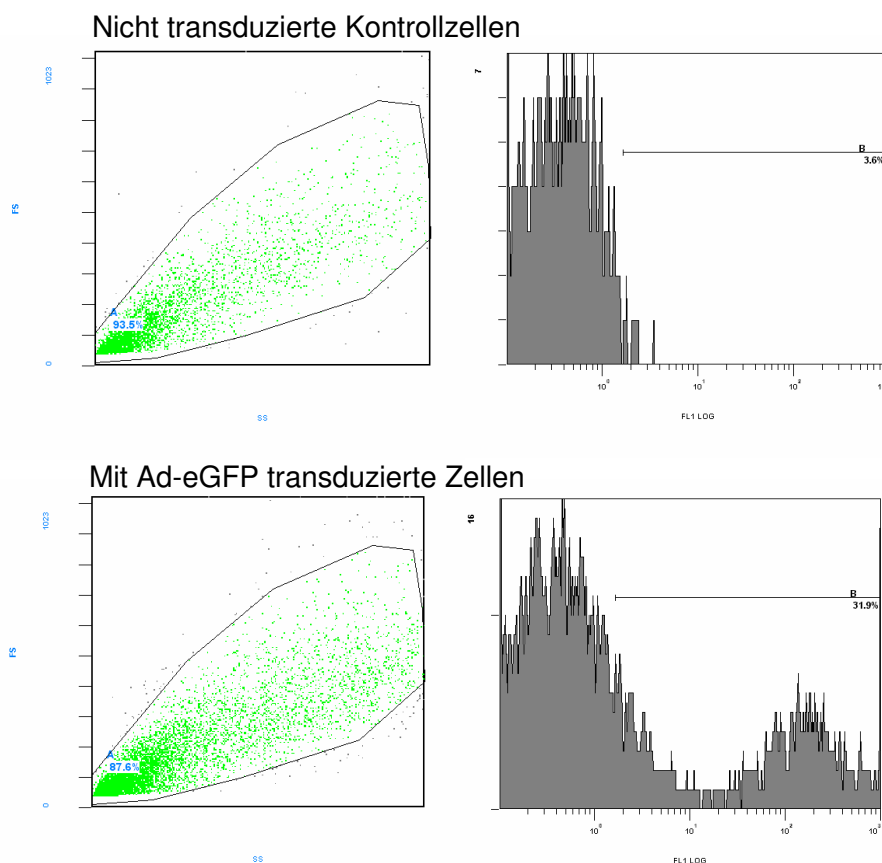


Abb. 46: FACS-Analyse zur Bestimmung der Transduktionseffizienz

FACS-Analyse zur Bestimmung der Transduktionseffizienz von hSMC der Neointima 48 h nach Transduktion mit Ad-eGFP bei MOI 500 (1 Tag Wachstum, serumfrei, 2×10^5 Zellen / 6 Well = 21052 Zellen / cm²) 5000 Zellen auf fluoreszierende Zellen untersucht im Vergleich zur Kontrolle (5000 nicht transduzierten Zellen)

Als Test der Transduktionseffizienz der neointimalen SMC wurde eine FACS-Analyse 48 h nach Transduktion mit Ad-eGFP bei einer MOI 500 von durchgeführt (Abb. 46). Dazu wurden 5000 Zellen untersucht im Vergleich zur Kontrolle aus nicht transduzierten Zellen. Die Transduktionseffizienz betrug etwa 30%.

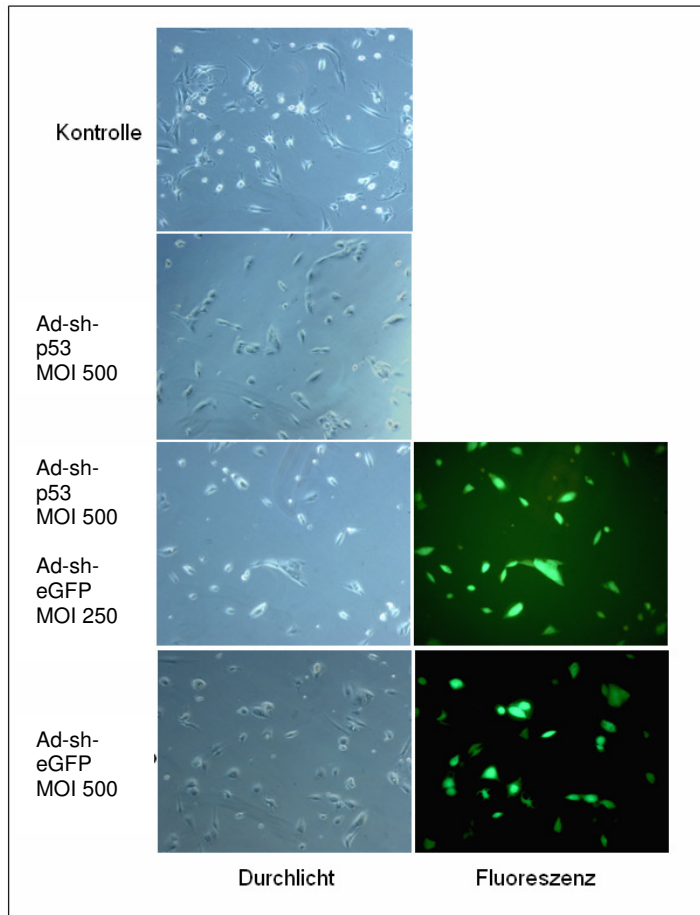


Abb. 47: Mikroskopische Analyse von nichttransduzierten und transduzierten hSMC der Neointima

Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von nichttransduzierten (Kontrolle) bzw. entweder mit Ad-sh-p53 (MOI 500) oder Ad-sh-eGFP (MOI 250 oder 500) transduzierten sowie mit beiden Viren kotransduzierten hSMC der Neointima

Anschliessend wurde eine zweite Charge hSMC der Neointima mit 500 MOI Ad-sh-p53, 500 MOI Ad-sh-p53 und 250 MOI Ad-eGFP bzw. 500 MOI Ad-eGFP transduziert. Nach 48h wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop photographiert. Die relative Zahl fluoreszierender Zellen diente als Maß für die Transduktionseffizienz. Diese betrug ca. 85% für die mit Ad-sh-p53 und Ad-sh-eGFP-transduzierten Zellen und 70% für die mit Ad-sh-eGFP allein transduzierten Zellen und war somit deutlich höher als die für die erste Zellpräparation mittels FACS ermittelte Transduktionseffizienz. Es zeigte sich eine veränderte Morphologie der Zellen.

4.4.3 Immunologischer Nachweis des p53-Knockdowns

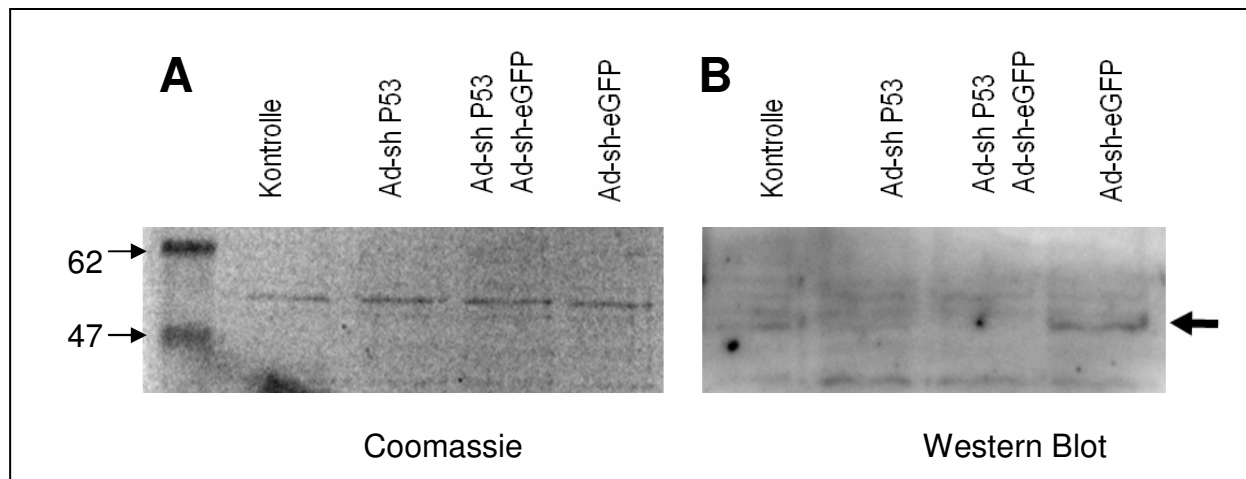


Abb. 48: Western-Blot von hSMC der Neointima nach Transfektion

(A) Coomassie-Brilliant-Blau-angefärbtes PAA-Gel,

(B) Detektion von p53 in Zellextrakten von nicht-transduzierten Kontrollzellen und mit Ad-sh-p53, Ad-sh-p53/Ad-eGFP und Ad-eGFP transduzierten Zellen im Western Blot.

Gleiche Mengen an Gesamtprotein (präpariert aus je 10^3 Zellen) wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12%igem PAA-Gel aufgetrennt. Die Position der P53-spezifischen Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Aus je 10^3 der nicht-transduzierten Kontrollzellen und der mit Ad-sh-p53, Ad-sh-p53/Ad-eGFP und Ad-eGFP transduzierten Zellen wurde 72 h nach Viruszugabe Gesamtprotein isoliert. Die Expression von p53 in den verschiedenen Zellextrakten wurde anschließend im Western Blot nachgewiesen. Wie in Abb. 48 B zu sehen ist, findet man sowohl in den Kontrollzellen als auch in den nur mit Ad-eGFP transduzierten Zellen eine Bande bei ca. 50 kDa, die in den Extrakten der mit Ad-sh-p53 transduzierten Zellen fehlt.

Die Auswertung ergab Änderungen hinsichtlich der Zellmorphologie, besonders bei den wt p53 sh RNA -transduzierten Zellen, die sich nur etwa einen Tag als lebensfähig erwiesen. Dies deutet darauf hin, dass eine Reduktion von p53 in SMC zur Induktion von Apoptose führen kann.

4.5 Effekte von Formaldehyd und Collagen auf SMC: Migration und Proliferation

Um den möglichen Einfluss verschiedener Patchmaterialien auf Zellen der Neointima und Media zu untersuchen, wurden hSMC der Neointima mit Formaldehyd und Glutaraldehyd behandelt und ihre Reaktion mittels MTT-Tests untersucht.

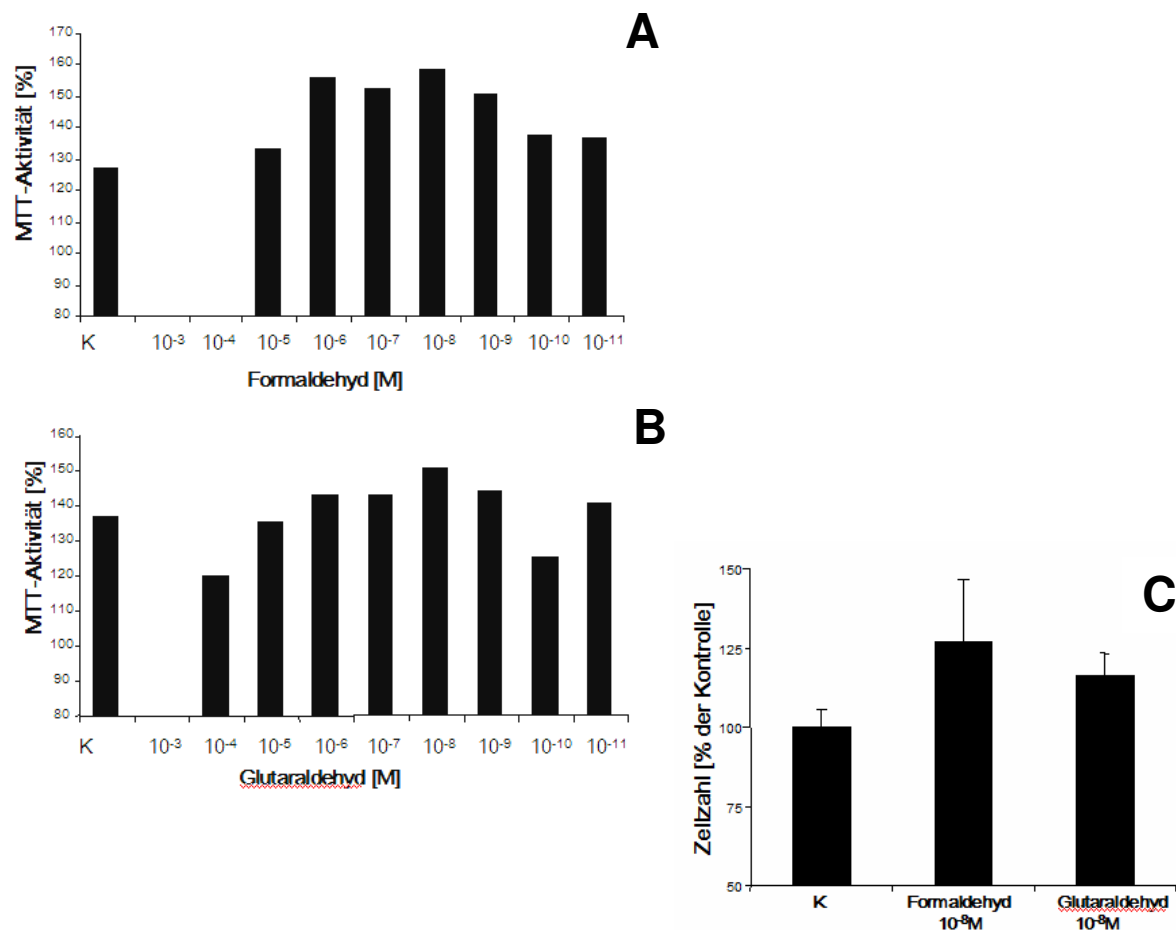


Abb. 49: MTT-Assay: Effekte von Formaldehyd und Glutaraldehyd auf hSMC der Neointima

- (A) Zellzahl von hSMC der Neointima nach Zugabe von 10^{-3} – 10^{-11} M Formaldehyd nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100 %, 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2);
- (B) Zellzahl von hSMC der Neointima nach Zugabe von 10^{-3} – 10^{-11} M Glutaraldehyd nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100 %, 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2);
- (C) Zellzahl von hSMC der Neointima nach Zugabe von 10^{-8} M Formaldehyd und 10^{-8} M Glutaraldehyd nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100 %, 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2) (*p < 0,05 versus Kontrolle)

Die hSMC der Neointima wurden jeweils mit 10^{-3} - 10^{-8} M Formaldehyd und Glutaraldehyd für 72 h inkubiert und die Zellzahl mittels MTT-Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt. Die hSMC der Neointima reagierten mit einer Erhöhung der Zellzahl auf Formaldehyd (Abb. 49 A) und Glutaraldehyd (Abb. 49 B). Niedrige Konzentrationen

zeigten keinen Effekt, während höhere Dosen ab 10^{-4} M für die hSMC toxisch sind. Die Zellzahl nahm bei einer Konzentration von 10^{-8} M bei Formaldehyd um 20 % und bei Glutaraldehyd um 15 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich zu (Abb. 49 C).

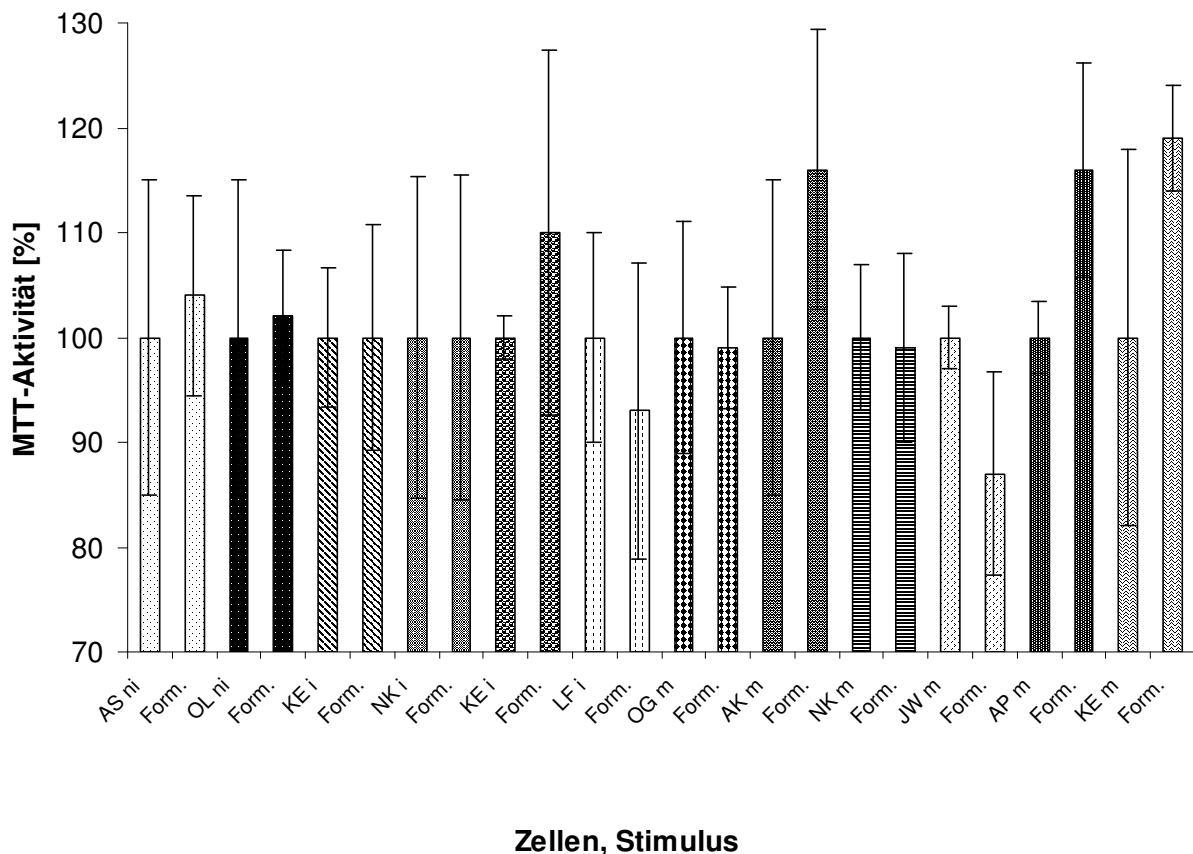


Abb. 50: MTT-Assay: Effekte von Formaldehyd auf hSMC

Zellzahl von hSMC der Neointima, Intima und Media nach Zugabe von 10^{-8} M Formaldehyd nach 72 h Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle = 100 %, Form. = Formaldehyd; 2 Tage Wachstum, 5000 Zellen / cm^2); (*p < 0,05 versus Kontrolle)

hSMC der Media, Intima und Neointima verschiedener Spender wurden mit 10^{-8} M Formadehyd für 72 h inkubiert und die Anzahl der Zellen mittels MTT-Test im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt (Abb. 50). Die hSMC reagierten je nach Spender unterschiedlich auf die Formalinzugabe, und bei einigen der Testzellen war eine Erhöhung der Zellzahl zu erkennen.

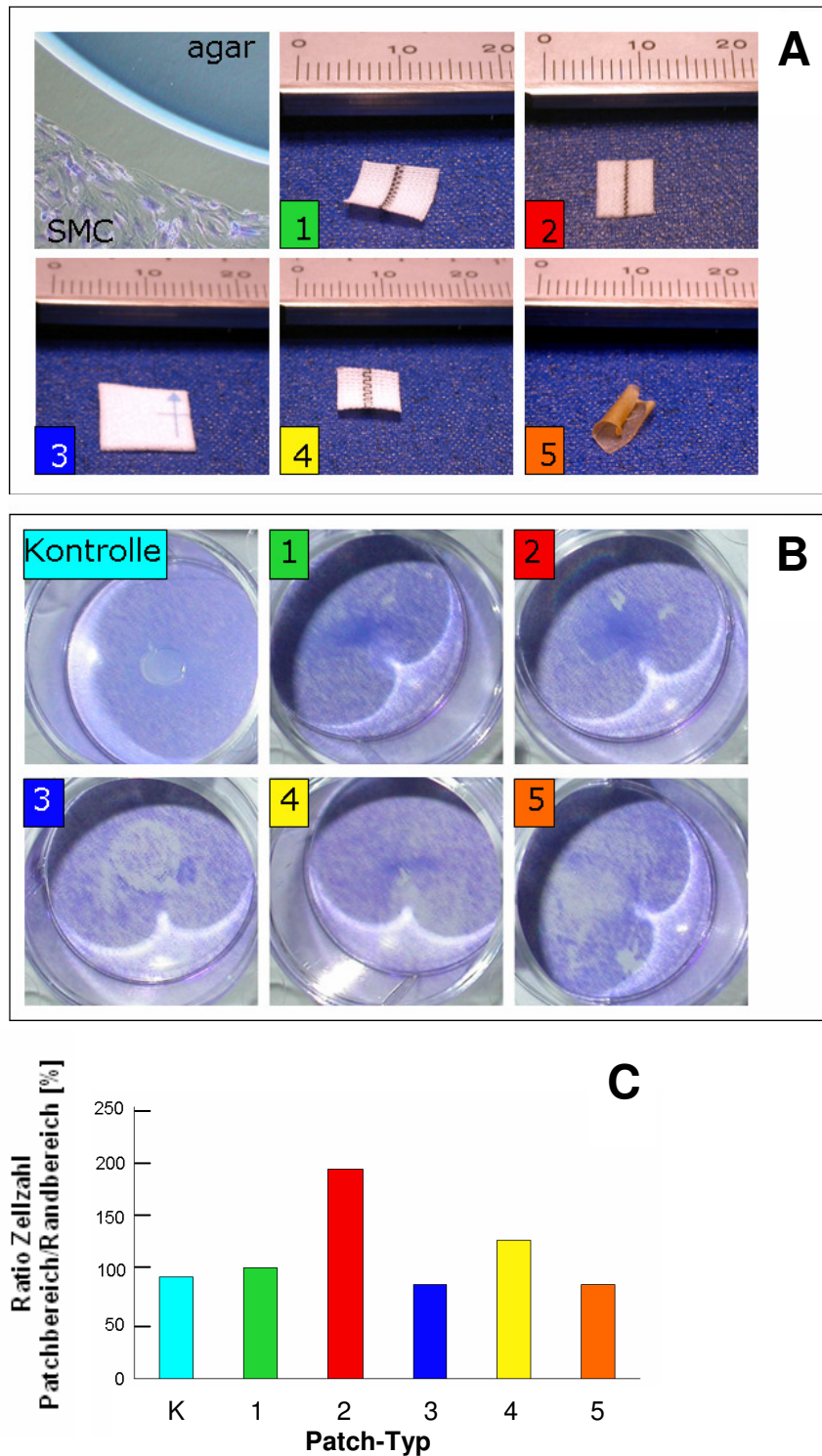


Abb. 51.: Effekte unterschiedlicher Patchmaterialien auf das Zellwachstum

(A) Agarose-SMC-Zellfront und verschiedene Patchstücke (Patch-Typen 1-5)

(B) Effekt unterschiedlicher Patchtypen (1-5) auf SMC-Proliferation (mit Agar in 6Well-Platte fixiert)

(C) Zellzahl im Bereich der Patches nach Inkubation mit Patch-Typen 1-5 im Vergleich zum Randbereich

Fünf verschiedene Patchmaterialien wurden mit Agar in der Mitte von 6-Well-Platten fixiert (Abb. 51 A, B). In der Kontrolle (nur Agartropfen am Boden des Wells) zeigte sich ein

gleichmäßiger Bewuchs der Zellkulturoberfläche rund um den Agar. Bei den unterschiedlichen Patchmaterialien zeigte sich im Randbereich der Patchstücke eine mehr oder weniger starke Akkumulation der Neointima hSMC (Abb. 51 B). Die Spektrophotometrische Analyse der fixierten und gefärbten SMC ergab eine deutlich gesteigerte Proliferation vor allem bei Patch #2 im Vergleich zur im Randbereich vorliegenden Zelldichte (Abb. 51 C). Die Analyse auf Formaldehyd zeigte, dass ein Patch des Typs #2 (6 x 75 mm) 0,8 μg (= 270 nmol) Formaldehyd enthielt.

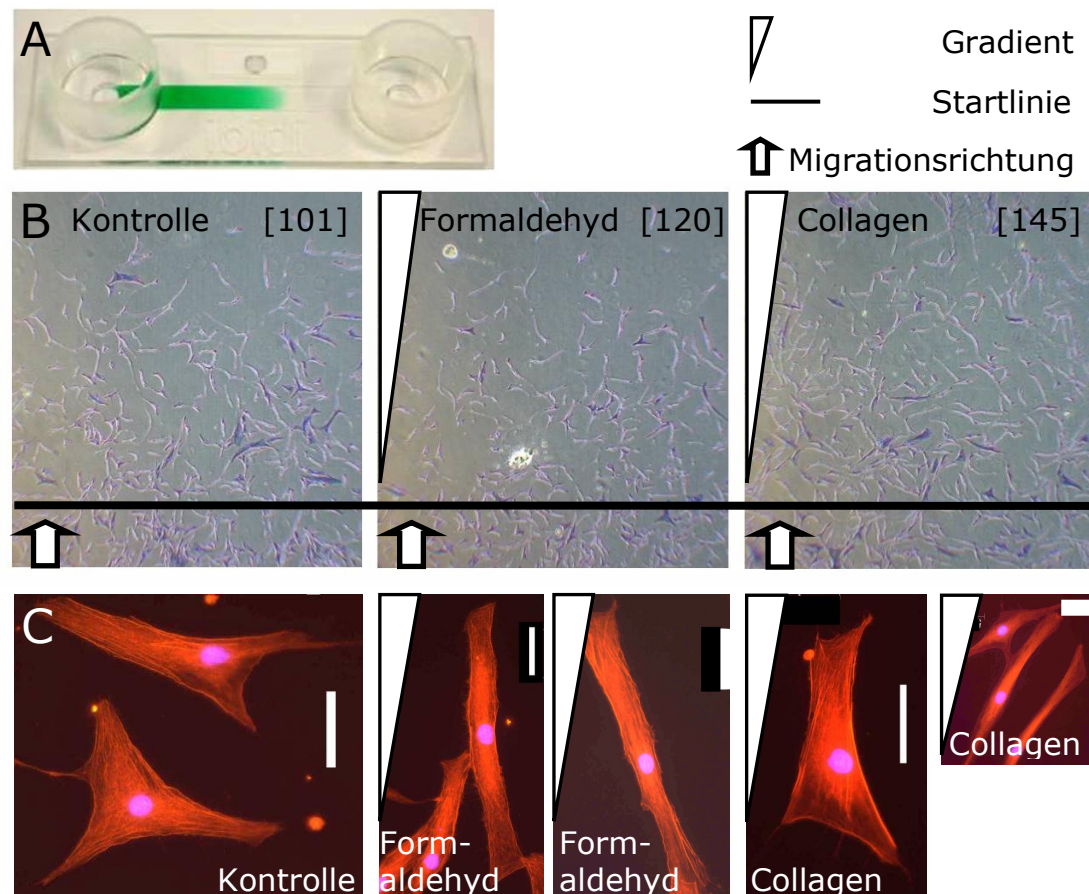


Abb. 52.: Migrationsassay

- (A) Ibidi-Kammer zur Migrations-Untersuchung mit grünem Farbgradienten (Simulation der Verteilung der Testsubstanz)
- (B) hSMC der Neointima - Migration in Richtung des Formaldehyd- oder Collagengradienten (Kontrolle, Collagen 0,1mg/ml, Formaldehyd 10^{-8}M) (mikroskopische Zellzahlbestimmung der migrierten Zellen),
- (C) Repräsentative Bilder der hSMC der Neointima in verschiedenen Gradienten mit Phalloidin-Färbung (Kontrolle, Collagen 0,1mg/ml, Formaldehyd 10^{-8}M)

Um einen möglichen Einfluss von Formaldehyd auf die Migration der Zellen zu untersuchen, wurden Migrationsassays mit Hilfe von Ibidi-Kammern durchgeführt. Die Migration der hSMC der Neointima erfolgte verstärkt in Richtung der aufgebauten Gradienten aus

Formaldehyd und Collagen und war im Falle des Collagengradienten (0,1 mg / ml) um etwa 45 % und im Falle des Formaldehydgradienten (10^{-8} M) um etwa 20 % erhöht. Die Phalloidin-Färbung zeigt nach Anfärbung der SMC eine Ausrichtung der Zellen in Richtung der aufgebauten Gradienten aus Collagen und Formaldehyd, während bei Zellen im Kontrollmedium keine Richtungspräferenz zu erkennen ist.

5. Diskussion

Die Inhibition bzw. Reduktion der Restenose als klinisches Problem ist von immenser Bedeutung, nicht zuletzt aus sozioökonomischer Sicht (Moliterno und Topol, 1998). Die möglichen Ansätze zur Reduktion und Prävention der Restenose sind die Plättchenaggregationsreduktion, die Inhibition der koronaren Thrombose, die Reduktion der Migration und Proliferation von SMC und auch die Verringerung und Vermeidung der adventitiellen Vernarbung. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle des p53 bei der Apoptoseregulation in SMC als Bestandteil des vaskulären Systems und atherosklerotischer Läsionen zu untersuchen.

Optimalerweise könnte eine inhibierte Apoptose in SMC atherosklerotischer Plaques mögliche Rupturen präventiv verhindern oder eine erhöhte Apoptose die mögliche Bildung stark proliferierender Neointima hemmen und somit die resultierende Gefäßverengung vermeiden (Thompson, 1995). Die an der neointimalen Hyperplasie beteiligten Zellen sollten in Hinblick auf Proliferation, Apoptose und p53 untersucht werden. Die Wirkung des p53 im Apoptoseablauf in der Neointima ist bisher noch weitgehend unbekannt. Die hSMC und rSMC der Media als auch Neointima, hUA SMC sowie L87-Zellen (mesenchymale Stammzelllinie) wurden mit verschiedenen Substanzen behandelt und ihre Reaktionen hinsichtlich der Apoptose und speziell des Proteins p53 untersucht. Dazu wurden die Proliferation mittels MTT-Test, die Apoptose mittels einer Doppelfärbung mit Annexin V/PI zur Messung der Phosphatidylserin-Exposition auf der Membranoberfläche mit FACS-Analyse und die Expression von p53, seinen phosphorylierten Formen P-p53 Ser15 und Ser46 sowie des Proteins PARP mit Western Blot untersucht. Durch Magnetofektion bzw. adenovirale Transduktion mit shRNA sollte ein siRNA-Modul für p53 die Folgen eines p53-*knockdowns* in SMC der Neointima aufzeigen.

5.1 Vergleichende Untersuchung von SMC der Media und Neointima

Beim Ablauf der neointimalen Hyperplasie migrieren Zellen der Tunica media in die Tunica intima und bilden aus den eingewanderten Zellen die sogenannte Neointima. Isolierte SMC der Media und Neointima wurden untersucht und verglichen. Beide Zellen zeigten in der Zellkultur ein unterschiedliches Verhalten. Die Zellen der Media wiesen zum einen eine langsamere Wachstumsgeschwindigkeit auf als Zellen der Neointima (Zellzahlen nach 4 Tagen Wachstum um 11% verschieden) und reagierten weniger sensitiv auf die Testsubstanzen als die Zellen der Neointima, was durch MTT-Assays, Apoptoseuntersuchungen als auch Western Blot festgestellt werden konnte.

Trotz der Aussaat von festgelegten Zellmengen pro cm² und daraus resultierenden Zelldichten könnte man durch das unterschiedliche Proliferationsverhalten vermuten, dass Zellen der Media weniger rasch einen ähnlich konfluenten Zustand wie die Neointima erreichen, was

eine weniger starke Reaktion der Zellen der Media auf die Testsubstanzen hervorruft. Das vermutete Erreichen eines Zellzyklusarrestes durch Kontaktinhibition der Zellen der Neointima bei sehr hohen Zelldichten durch die schneller proliferierende Neointima tritt nicht ein. Die Zellen der Neointima verhalten sich sensibler gegenüber den eingesetzten Testsubstanzen als die Zellen der Media. Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Interaktionen und ausgeschüttete Botenstoffe regulieren zelldichteabhängig die Apoptose. Bei hohen Dichten existiert ein Schutz gegenüber schädlichen Einflüssen, bei niedrigen Zelldichten hingegen reagieren die Zellen schnell apoptotisch. Hohe Zelldichten und damit ein enger Verband mit den Nachbarzellen entsprechen dabei ähnlichen physiologischen Bedingungen wie *in vivo* (Midgley et al., 1995). Es wird vermutet, dass bei hohen Zelldichten Faktoren zur Unterdrückung der DNA-Antwort sekretiert werden. Unter Umständen wandelt die hohe Kulturdichte die Zielgenspezifität von p53 ab und antiapoptotische Gene werden favorisiert exprimiert, was zu einer erhöhten Zytoprotektion führt (Bar et al., 2004). Die höhere Empfindlichkeit proliferierender Zellen gegenüber äußeren Einflüssen spielt, da die Media als niedrig proliferierend gilt, ebenfalls eine Rolle bei der unterschiedlichen Reaktion beider Zellen (Kisselev und Goldberg, 2001).

Zellen der Neointima haben eine reduzierte p53- Aktivität und durch die Phosphorylierung des Serin 15 eine reduzierte DNA-Bindekapazität, was im Hinblick auf die Apoptose ein möglicher Grund für das differente Verhalten sein könnte (Yonemitsu et al., 1998; Moroi et al., 2003).

Die Zellen der Neointima reagieren in den ersten 6 h nach Behandlung weniger als die Zellen der Media, nach 24 h jedoch neigen sie mehr zur Apoptose als die Zellen der Media, was auf eine Kinetik der Apoptoseinduktion schließen lässt. Ein unterschiedlicher zeitlicher Ablauf der Apoptose in Media und Neointima könnte ein Ursprung der differenten Ergebnisse sein. Pollman et al. vermuteten 1998 die erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine wie z.B. Bcl-xL als Ursache der langsameren anfänglichen Reaktion der Neointima. Dabei verzögert die erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins in der Neointima die Apoptose, verhindert diese aber zeitlich betrachtet nicht.

Nach Bellas et al.(1995) kann die unterschiedliche Reaktion der Zellen der Neointima und Media möglicherweise durch den NFκB-Signalweg begründet werden, dessen Aktivität essentiell für die Proliferation vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen ist. Bei NFκB-Hemmung erfolgt Apoptose (Erl et al., 1999). Aus der Neointima generierte vaskuläre SMC weisen eine erhöhte NFκB-Aktivität auf, was eine Begründung für das unterschiedliche Verhalten der Zellen sein kann (Bu et al., 2005). Die erhöhte Empfindlichkeit der Neointima bezüglich der Apoptose-Induktion könnte über eine Inhibition von NFκB durch die Statinbehandlung begründet werden (Ortego et al., 1999).

Grundsätzlich kann man also eine Zellart-abhängige Reaktion der Zellen hinsichtlich Proliferation, Apoptose und auch Expression von Proteinen erwarten, die auf die Migration

der SMC von der Media in die Intima und dadurch unter Umständen hervorgerufene intrazelluläre Veränderungen zurückzuführen sein kann.

Um auf den Zustand *in vivo* und damit die Wechselwirkungen der Zellen in der Arterie einzugehen, wurden erste Versuche mit Kokulturen begonnen, um zumindest den Effekt von Neointima- und Media-Zellen in direkter Nähe zu beobachten. Bisherige Ergebnisse zeigten eine Tendenz einer Unempfindlichkeit der Zellen in Kokultur gegenüber den Stimuli. Es wäre für zukünftige Versuche zu überlegen, ob gezielt geschichtete Neointima- und Mediazellen nicht im Verband zu testen und möglicherweise auch im fließenden System für die durchgeführten Versuche denkbar wären. Mögliche Unterschiede der Zell-Monokulturen gegenüber einer Kokultur wären zu differenzieren.

Bezüglich der verwendeten Spezies bleibt anzumerken, dass die Zellen der Ratte mit den humanen Zellen vergleichbar sind, aber aufgrund beispielsweise unterschiedlicher p53-Proteine das System nur mit Vorsicht vom Tiermodell auf das humane Modell übertragbar ist (Erl, 2005).

5.2 Einfluss von Statinen auf die Proliferation und Apoptose in SMC

Für die Entwicklung vaskulärer Läsionen wie bei Atherosklerose, post-angioplastischer Restenose oder Transplantat-Vaskulopathie ist die Proliferation der SMC ein ausschlaggebender Punkt. Wie bereits erwähnt, führt die Migration der SMC der Media in die Tunica intima, stimuliert durch Chemokine und Wachstumsfaktoren, zur Ausbildung der Neointima. Weitere Proliferation der SMC führt zur Lumeneinengung des betroffenen Blutgefäßes. Die Proliferation und Migration dieser Zellen ist somit die Grundvoraussetzung für die Restenose und damit eine Schlüsselreaktion für die Zielsetzung der Arbeit.

Aus den durchgeführten Versuchen wird zunächst deutlich, dass Statine und vor allem das getestete Lovastatin eine Zellzahl-reduzierende Wirkung auf die Proliferation der hSMC der Neointima und Media haben. Die Reaktion verläuft konzentrationsabhängig, ist aber je nach Zellart unterschiedlich stark ausgeprägt. Zellen der Neointima reagieren dabei wesentlich sensibler als die Zellen der Media auf Lovastatin. Bei gesteigerter Proliferation nach Inkubation mit nicht als proliferationssteigernd bekannten Substanzen ist möglicherweise eine kurzzeitig starke angeregte mitochondriale Dehydrogenase als Ursache denkbar. Die Exposition des im Laufe der frühen Apoptose umgelagerten Phosphatidylserins in der Zellmembran und die Anfärbung der apoptotischen Zellen mit Annexin V gelten als ein klassischer Nachweis der Apoptose. Neben der Messung der Proliferation der verwendeten Zellen nach der Inkubation mit Testsubstanzen wurde der Effekt auf Apoptose mit Durchflusszytometrie und einer Annexin V/PI-Färbung bestimmt. Eine gleichzeitige Anfärbung nekrotischer Zellen durch das sich einlagernde Propidiumiodid unterschied diese

Zellen von den apoptotischen. Fortschreitende Apoptose und damit sekundär nekrotische Zellen führten im Rahmen der FACS-Analyse zu hohen Anzahlen Annexin V-negativer PI-negativer Zellen und, im Vergleich zur Kontrolle, zu stark verringerten Gesamtzellzahlen, die sich durch eine Zersetzung der Zellen und damit nicht mehr messbaren Zelleinzelbestandteilen („Zellschrott“) erklären könnten.

Wie bereits aufgezeigt, gibt es mehrere Wege der Apoptoseinduktion. So ist neben dem Signaltransduktionsweg über p53 auch auf andere Art und Weise Apoptose induzierbar (siehe Kapitel 1.5, Induktion über ligandenaktivierten Signalweg). Eine in den MTT-Messungen reduzierte Zellzahl bzw. Proliferation als auch der Ablauf der Apoptose müssen also nicht ein Indiz für eine über p53-ablaufende Apoptose sein, sondern können, unabhängig von p53, dessen Expression und Aktivierung sein.

Lovastatin verursacht bei hSMC der Neointima deutlich Apoptose. Mit zunehmender Statinkonzentration steigt die Anzahl apoptotischer Zellen. Die humane Media reagiert ebenfalls mit einer Apoptoseinduktion auf die Lovastatingabe. Bei rSMC hingegen reagiert nur die Neointima auf den Stimulus mit einer Apoptoseinduktion. Die in der Neointima der Ratte ausgelöste Apoptose nach kombinierter Zugabe von Lovastatin und PFT α entspricht einer Wirkungssteigerung. Die vermutete protektive Reaktion von PFT α hinsichtlich der Apoptose durch Lovastatin tritt nicht ein. Dies könnte möglicherweise dadurch begründet sein, dass PFT α zwar p53 inhibiert, die Apoptose aber nicht über den p53-Signalweg abläuft.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wird erkennbar, dass Statine eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Proliferation der Zellen haben. Statine verursachen konzentrationspezifische Effekte bezüglich Proliferation, Apoptose als auch Migration in SMC, die *in vitro* unabhängig von ihren lipidsenkenden Eigenschaften sind (Corsini et al., 1991; Hidaka et al., 1992). Die Statinbehandlung hat eine deutliche Reduktion der Restenoseraten in zahlreichen Tierversuchen gezeigt, während in klinischen Studien meist keine signifikante Reduktion der Restenose durch Statinbehandlung nachgewiesen werden konnte (Soma et al., 1993; Erl, 2005). Die membrangängigen Statine verursachen im Organismus bzw. der Zelle eine Senkung des Bcl-2-Spiegels als auch eine Bax-Hochregulation, was zu einer apoptotischen Reaktion führt (Blanco-Colio, 2002). Sie verringern dosis-abhängig die Proliferation der SMC durch die Verlangsamung des Zellzyklus in den G1 und G2/M Phasen, welche dann zur Apoptose führen kann (Baetta et al., 1997). Der Effekt ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu beobachten (Soma et al., 1993). Die Induktion der Apoptose in SMC durch Statine wurde 1998 erstmals durch Guijarro et al. publiziert. Studien zeigen eine verminderte Bildung der Neointima mit Werten von 20 -80 % Reduktion in der Restenoserate (Sahni et al., 1991).

In einigen Veröffentlichungen wird den Statinen eine präventive Funktion beim Verlauf der Atherosklerose zugeschrieben, in anderen keinerlei Wirkung diesbezüglich (Doggrell, 2001; Liao, 2002).

Beim Einsatz verschiedener Statine ist eine Reaktionsreihenfolge der Effekte auf Apoptose zu erkennen (Abb. 53) (Veillard und Mach, 2002; Ikeda und Shimada, 2001). Pravastatin verursacht keine Proliferations-Reduktion oder Apoptoseinduktion, da es als am wenigsten lipophiles Statin kaum mit der Zellmembran interagieren kann (Veillard und March, 2002). Cerivastatin, das wegen seiner Nebenwirkungen vom Markt genommen wurde, ist das wirkungsvollste Statin, welches im nanomolaren Bereich (Plasmaspiegel 4,9 nM) wirkt (Tab. 4, Anhang). Als Lipidsenker und bezüglich seiner pleiotropen Effekte wäre es ein potentes Mittel, um Restenose präventiv nach Angioplastie zu verhindern, da es im Vergleich zu Lovastatin gleiche Effekte bei 100fach niedrigerer Dosis verursacht (Siegel-Axel, 2003; Igarashi et al., 2002).

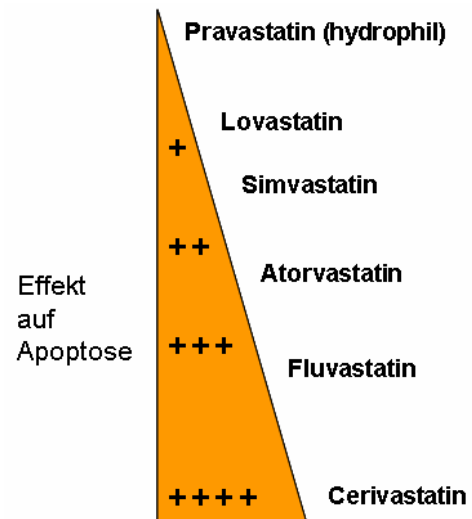


Abb. 53:
Schematische Reaktionsreihenfolge der Statine in Bezug auf ihren Apoptose-Effekt

Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass exponentiell proliferierende Zellen, wie bereits eingangs erwähnt, anfälliger auf Statinbehandlung sind als ruhende SMC (Sindermann et al., 2000). In Bezug auf das verletzte Gefäß mit nicht oder niedrig proliferierender Media und coexistierender exponentiell proliferierender Neointima beeinträchtigen die eingesetzten Statine die Neointima wesentlich stärker (Indolfi et al., 2000; Orlandi et al., 1994). Der direkte Zell-Zell-Kontakt von SMC der Neointima mit der Media reduziert die Anzahl sterbender Zellen der Neointima nach Lovastatin. Ebenfalls verursacht eine hohe Zelldichte an Media-Zellen in Kokultur den proliferationssenkenden und proapoptotischen Effekt von Lovastatin auf Zellen der Neointima (Erl et al., 2003). Der Zellkontakt wirkt in diesem Zusammenhang als protektiver Faktor und die hohe Zelldichte der Zellen der Media bewirkt möglicherweise eine Sekretion von antiapoptotischen Faktoren.

Die lokale Konzentration der Statine durch orale Aufnahme oder als DES-Substanz ist im Vergleich zur Zellkultur bei der Übertragung der erhaltenen Ergebnisse auf ein Tiermodell oder für Rückschlüsse *in vivo* zu berücksichtigen. *In vitro* eingesetzte Konzentrationen lagen bei 0,6 – 40 μM , wobei ab 10 μM ein deutlicher Apoptose-induzierender Einfluss zu erkennen war. Eingesetzte Konzentrationen am Beispiel von Lovastatin am Patienten *in vivo* betragen 10 – 40 mg / d, der Plasmaspiegel liegt bei 23 – 162 nM. Nach oraler Aufnahme wird eine Konzentrationen von etwa 0,05 μM erreicht (Lovastatin, Tabelle 4,5, Anhang).

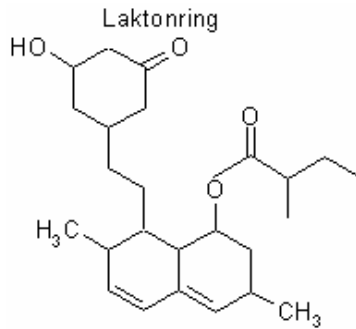


Abb.54. Strukturformel
von Lovastatin

Das verwendete Lovastatin besitzt einen Laktonring und ein Cyclohexan. Im Laufe der Aktivierung wird der intramolekulare cyclische Ester, der ein Ester der Hydroxysäure ist, zur Wirkform mit einer Hydroxysäure umgewandelt, welche nun eine ringoffene Form aufweist und über reaktive Carboxyl- und Hydroxylgruppen verfügt, die möglicherweise die Wirkung des Moleküls ausmachen könnten. Die intramolekulare Esterbindung verstärkt die hydrophobe Wirkung des Moleküls. Statine wie Simvastatin und Atorvastatin wirken zeit- und konzentrationsabhängig über Rho GTPasen hemmend auf die Bcl-2-Expression, was Apoptose zur Folge hat (Blanco-Colio et al., 2002).

Für mögliche Vergleiche des Zellkulturmodells mit einem Tiermodell ist die Metabolisierung der Statine zu berücksichtigen, die im Fall der Zellkultur nicht stattfindet. Im *in vivo* System erfolgt die Wirkung der Statine durch die durch CYP-Enzyme metabolisierte Form (effektive Wirkform), während *in vitro* die Wirkung durch die unmetabolisierten *prodrugs* entsteht.

Lovastatin und Simvastatin werden als *prodrugs* durch Hydrolyse und Oxidation in ihre aktive Form überführt, während alle anderen Statine in ihrer Wirkform verabreicht werden. Die Absorption beträgt im Darmtrakt zwischen 30 und 98 %, die Statine sind dabei einem hohen First-Pass-Effekt unterlegen, wodurch nur ein Bruchteil des Wirkstoffes den Wirkort erreicht. Die Passage durch die Leber und die Modifikation durch die CYP450-Enzyme verursachen Veränderungen, wodurch die Statine hepatisch (biliäre Exkretion) oder renal (renale Sekretion) eliminiert werden. Die Bioverfügbarkeit wird durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme als auch die Aktivität des P-Glykoproteins beeinflusst. Die starke Bindung an Plasmaalbumin senkt zudem zusätzlich die systemisch freie Wirkkonzentration (Fichtl, 2001).

Zu unterscheiden sind somit die an den Wirkort gelangte Konzentration an aktiven, nicht metabolisierten Statinen als auch die Konzentration der *in vitro* eingesetzten *prodrugs*. Verstärkte Konzentrationen des Pharmakons an der Läsion könnten zu besseren protektiven Effekten der Statine führen. Als Beispiel sei an dieser Stelle ein DES mit einer Beschichtung mit 140 µg Sirolimus / cm² erwähnt, was in etwa 3 % der Tagesdosis der systemischen Anwendung beträgt (HWZ: 1 Woche).

Statine verursachen in der verwendeten Zellkultur der SMC eine konzentrationspezifische Reduktion der Zellzahl und induzieren Apoptose. Durch Untersuchungen der Proteinexpression der SMC hinsichtlich der Aktivierung des p53 sollen die erhaltenen Ergebnisse Rückschlüsse darauf geben, ob die verursachte Apoptose über den p53-Signalweg abläuft oder ob möglicherweise andere Prozesse beteiligt sind.

5.3 Einfluss von PRIMA-1 und PFT α auf die Apoptose

Der zellpermeable p53- Reaktivator PRIMA-1 bewirkte eine deutliche Reduktion der Zellzahl der Neointima und verursacht Apoptose. Strukturell aus einem Azabicyclooctan und zwei Hydroxymethylgruppen bestehend, bewirkt PRIMA-1 die Reaktivierung des p53, indem es das Protein in seine aktive Konformation bringt. Die DNA wird wieder bindefähig und p53 damit funktionsfähig, wodurch Apoptose ausgelöst wird. Die apoptotische Wirkung und Reduktion der Zellzahl der SMC ist vermutlich auf eine Reaktivierung des p53 und damit erhöhte Spiegel an p53 nach der Inkubation mit PRIMA-1 zurückzuführen. Das proapoptotische Protein Bax wird ebenfalls aktiviert, als auch der JNK Signalweg inhibiert (Wang et al., 2006). Bisher wurde PRIMA-1 noch nicht systemisch angewendet, um mutiertes und damit funktionsunfähiges p53 im Falle einer Tumorerkrankung wiederherzustellen und es liegen keine Daten bezüglich möglicher *in vivo* anzuwendender Konzentrationen vor. Von Vorteil ist seine Fähigkeit, auch in Abwesenheit anderer zellulärer Proteine zu wirken, was ein Indiz für die direkte und selektive Interaktion zum mutierten p53 sein könnte (Bykov et al., 2002).

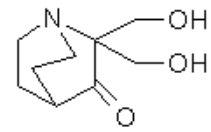


Abb. 55.:
Strukturformel
von PRIMA-1

Die Gabe des reversiblen p53-Inhibitors Pifithrin α verursacht abgeschwächte Effekte hinsichtlich der Zellzahlreduzierung nach Statinzugabe und weist damit eine deutliche protektive Wirkung auf. Strukturell besteht Pifithrin α aus einem Benzothiazol, an das eine reaktive Imin-Gruppe gebunden ist sowie einer Carbonylgruppe und einem Toluol.

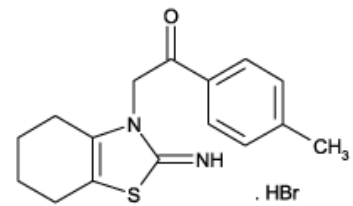


Abb. 56: Strukturformel von
Pifithrin- α als Hydrobromid

Der Effekt von Pifithrin α auf die Proliferation bei rSMC war gering und erst bei hohen Zelldichten und hohen Konzentrationen (40 μ M) zeigte sich eine Reaktion, die vermutlich auf Zytotoxizität zurückzuführen ist. Auf die hSMC hatte Pifithrin α keine proliferationsverändernde Wirkung. Pifithrin α scheint bei den rSMC der Neointima Apoptose zu verursachen. Bei der immortalen Zelllinie L87 verursacht Pifithrin α ein ähnliches Resultat wie Lovastatin und wirkt apoptotisch. Bei Kombination von Pifithrin α mit Apoptose verursachenden Substanzen konnte die proapoptotische Wirkung meist verringert oder aufgehoben werden. Bei Betrachtung der Neointima-Zellen der Ratte war eine deutliche Zellzahlreduktion mit zunehmenden Konzentrationen an Pifithrin α und Lovastatin zu erkennen, hingegen bei den Media-Zellen nur eine sehr geringe Reduktion der Zellzahl, was möglicherweise ein Hinweis auf ein unterschiedlich reaktives p53-System in den Zellarten bedeuten könnte. Die protektive Wirkung des Pifithrin α konnte ebenfalls in den Apoptose-Versuchen und den Proteinexpressionsanalysen nachgewiesen werden. Bei den als Modell exemplarisch genutzten L87-Zellen zeigte sich eine Apoptoseinduktion nach gleichzeitiger

Gabe von Pifithrin α und Doxorubicin, was vermutlich durch die starke apoptotische Wirkung von Doxorubicin verursacht wurde.

Der Mechanismus der Wirkung des Pifithrin α ist noch unbekannt; es ist lediglich bekannt, dass es die transkriptionelle Aktivität des p53 blockiert und den nukleären Transport unterbricht. Es inhibiert die p53-abhängige Apoptose und damit *downstream* Effekte wie die Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung. Pifithrin α hemmt die Expression von Bax, Bcl-2 und Mdm2 und die Gentranskription von Cyclin G, p21/Waf1 und Mdm2 (Proietti De Santis et al., 2003). Die Expression und Translokation des p53 wird unterdrückt, seine nukleäre Stabilität reduziert.

5.4 Einfluss von Doxorubicin auf die Apoptose

Das Anthracyclin-Antibiotikum Doxorubicin verursacht ebenfalls eine Proliferationssenkung. Indiz für die durch Doxorubicin verursachte Apoptose ist ein deutlich in zwei Untereinheiten gespaltenes PARP-Protein im Nukleus. Doxorubicin reduziert stark die Proliferation der verwendeten Zellen und verursacht Apoptose. Vor allem die als Modell genutzten L87-Zellen zeigten eine starke Apoptoseinduktion durch Doxorubicin, was auch im Western Blot verifiziert werden konnte.

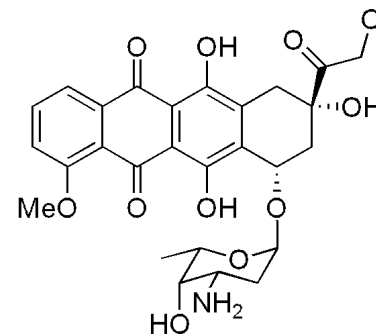


Abb. 57.: Strukturformel von Doxorubicin

Bestehend aus einem glykosidisch mit einem Tetracyclinring gebundenen Aminozucker Daunosamin, interkaliert Doxorubicin in DNA und RNA, was Apoptose zur Folge hat. Es hemmt die, Topoisomerase II, welche an der Topologie der DNA beteiligt ist, und bewirkt somit eine gehemmte Zellteilung. Des Weiteren werden die Expression des proapoptotischen Proteins Bax erhöht, Caspasen aktiviert und somit die Apoptose verstärkt. Das im Patienten angewandte Pharmazeutikum wird in Konzentrationen von 10 – 60 mg/d eingesetzt, wohingegen *in vitro* Konzentrationen von 1-5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (entspricht etwa 5 – 30 mg / d) verwendet wurden.

5.5 Expression von p53 und *knockdown*

Die Expression des p53 und dessen Aktivierung durch Phosphorylierung der Serine 15 und 46 durch verschiedene Stimuli waren im Rahmen der Versuche der nächstfolgende Schritt nach Überprüfung der Beeinflussung der Proliferation und Apoptoseinduktion.

Mittels Western Blot wurde die Expression von p53, seinen phosphorylierten Serinen 15 und 46 als auch des Proteins PARP untersucht. Im Falle der Apoptose ist ein gespaltenes PARP-Protein zu erwarten und ein möglicherweise phosphoryliertes p53. Falls die Apoptose über

einen anderen Signalweg als p53 abläuft, ist ein nicht phosphoryliertes und damit inaktives p53 zu erwarten.

Bezüglich der Aktivierung des p53 sind zahlreiche Kinasen bekannt, die zur Phosphorylierung des Proteins dienen. Die Phosphorylierung des Serin 15 ist für die Aktivierung des Proteins essentiell, da es sich in der sauren Transaktivierungs-Domäne befindet, welche hochkonserviert für die Bindung an Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie verantwortlich ist. Die Phosphorylierung des Serin 15 verursacht eine reduzierte DNA- Bindefähigkeit durch die Interaktion mit dem *cAMP response element-binding protein /binding protein p300* (Lambert et al., 1998). Eine Mutation im Serin 15 schwächt die Fähigkeit von p53 zur Apoptoseinduktion (Lin et al., 2002). Auch Serin 46 reguliert die Fähigkeit der Apoptoseinduktion (Oda et al., 2000). Ein phosphoryliertes p53 deutet also auf eine Aktivierung des Proteins hin. Des Weiteren wird eine Hochregulation des proapoptotischen Bax im Zusammenhang mit der Phosphorylierung gesehen (Choi et al., 2002).

Die Bindung an das Protein Mdm2 spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung des p53, denn durch die Phosphorylierung des Serin 15 und damit die Stabilisierung des p53 wird die Bindung gelöst (Shieh et al., 1997). Der Verlust der Aktivität des p53 wird in diesem Zusammenhang als möglicher Grund für die Restenosebildung genannt (Speir et al., 1994). Das p53 ist in hochkonfluenten Zellkulturen kurzlebig, ein inhibitorischer Effekt tritt erst nach etwa 48 h ein (Bar et al., 2004). Dem zugrunde liegt ein Dichte-abhängiger Zellzyklus-Arrest (Kontaktinhibition) als Konsequenz der hohen Dichte. Das Protein ARF wird für die Dichte-abhängige Inhibition der p53-Induktion ebenfalls verantwortlich gemacht, indem es an Mdm2 bindet und somit die Degradation von p53 verhindert. Des Weiteren werden bei hohen Zelldichten keine proapoptotischen Effekte verursacht (Erl et al., 1999, 2000). Die Protektion durch Zell-Zell-Kontakte kann über Cadherine erfolgen, die die Sensitivität der Zellen bei hoher Dichte für p53 induzierte Apoptose verringert (Bar et al., 2004) Bei niedrigen Dichten entsteht kaum Zell-Zell-Kontakt sondern überwiegend Zell-Substrat-Kontakt.

Es ist zu berücksichtigen, dass die meisten p53 Studien mit Kulturen von subkonfluenten Zellen durchgeführt wurden und das p53 meist durch genotoxischen Stress hochreguliert wird, was nicht im Kontext des Gesamtorganismus steht (Midgley et al., 1995). Um eine annähernde Situation wie *in vivo* zu simulieren, kann die Entfernung von Wachstumsfaktoren, ein Serumentzug, als etablierte Methode zur Apoptoseinduktion bei SMC eingesetzt werden (Wang, 2003). Im Zelldichtebereich von 2000 – 15000 Zellen/cm² bei den SMC spielte die Dichte eine eher nebensächliche Rolle, da in diesem Bereich die Zellen linear auf Apoptosestimuli reagierten.

Des Weiteren besitzen verschiedene Spezies auch verschiedene Formen an p53 (Ratte: 387 AS; Human: 393 AS), was unter Umständen auch eine Begründung teilweise aufgetretener Unterschiede sein könnte.

Bezüglich der Genexpressionsuntersuchungen zeigt Lovastatin bei den hSMC der Neointima keine Wirkung auf die Expression von PARP, P-p53 (Ser15) und p53, was zu erwarten war, da vorherige Messungen nach Lovastatinzugabe eine gesenkte Zellzahl und Apoptoseinduktion zur Folge hatten. Es ist also zu vermuten, dass Lovastatin nicht über den p53-Signalweg Apoptose auslöst, da p53 nicht vermehrt exprimiert wird und auch keine Phosphorylierung festzustellen ist. Humane Media SMC reagieren auf Lovastatin nicht mit Genexpressionsveränderungen, was ebenfalls auf einen alternativen Apoptoseweg hindeutet. Erstaunlicherweise reagieren die L87-Zellen auf den Lovastatinstimulus mit einer Spaltung des PARP-Proteins, aber keiner wesentlichen Veränderung der Expressionslevel von p53 oder seiner phosphorylierten Formen. L87 Zellen weisen im Gegensatz zu den SMC eine hohe Grundexpression an p53 auf. Dies führt zu der Vermutung, dass Statine und speziell Lovastatin keine direkte Wirkung auf das p53-System und die über p53 induzierte Apoptose haben.

Durch den Einsatz von Doxorubicin als Stimulus wurden deutliche Veränderungen bezüglich der Genexpression erkennbar. Das PARP-Protein wurde gespalten und war mit seinen Untereinheiten detektierbar. Zunächst bei den L87-Zellen beobachtet, wurde PARP durch Doxorubicin in eine 89 und 24 kDa Einheit gespalten, was ein Indiz für Apoptose ist. Bei Betrachtung der p53-Expression wurde nach Gabe von Doxorubicin eine deutlich schwächere Expression von p53 als bei der unbehandelten Kontrolle ersichtlich. p53 wurde nicht verstärkt phosphoryliert. Das führt zu der Vermutung, daß p53 unter Umständen degradiert wird und deshalb nicht mehr detektierbar ist. Wie bereits erwähnt, ist Mdm2 auch an der Degradation des p53 beteiligt, was eine Ursache des degradierten Proteins sein könnte. Diesbezüglich wäre der Einsatz von Nutlin-3, einem Mdm2- Hemmer für zukünftige Versuche denkbar.

Die hSMC der Neointima reagieren ebenfalls mit einem gespaltenen PARP-Protein auf die Zugabe von Doxorubicin, einer stark erhöhten Expression von P-p53 (Ser15) und einer erhöhten Expression an p53. Die zusätzliche Gabe von Pifithrin α reduziert die Expressionssteigerung von p53 und PARP-Spaltung nur gering. Die humane Media reagiert ebenfalls auf Doxorubicin, welches eine Expressionssteigerung an p53 und seinem phosphorylierten Serin 15 hervorruft, während die Zugabe von Pifithrin α eine geringere Expressionssteigerung an p53 und P-p53 Ser15 verursacht.

Bei Betrachtung der rSMC der Neointima wird eine Spaltung des PARP-Proteins nach der Zugabe von Doxorubicin ersichtlich, ebenso wie die Expressionssteigerung des phosphorylierten Serin 15 des p53 als auch die des p53. Auch hier mindert die Zugabe von Pifithrin α kaum den Effekt. Es liegt die Vermutung nahe, dass Doxorubicin im Gegensatz zu Lovastatin an dieser Stelle über das p53-System Apoptose verursacht. Indizien für die p53-abhängige Apoptose sind die vermehrte Expression des p53, die erhöhte Phosphorylierung des p53 an Serin 15 und die Spaltung des PARP-Proteins. Im Fall der p53-unabhängigen

Apoptose sind ein gespaltenes PARP-Protein, aber keine Veränderungen des Expressionsspiegels von p53 und P-p53 Ser15 zu erwarten.

Die Magnet-unterstützte Transfektion von validierter p53-siRNA führt trotz dreifach-Transfektion nicht zur Reduktion von p53 Protein in hSMC. Deshalb wurden die Zellen mit Hilfe von Adenoviren und shRNA transduziert, um ein *knockdown* von p53 zu erreichen. Nach gezieltem *knockdown* des p53 sollte die Wirkung der Statine auf die Zellen untersucht werden, um mögliche Rückschlüsse bezüglich der Aktivierung des p53 und Auslösung der Apoptose durch Statine zu erhalten.

Erste Tests der Transduktionseffizienz nach einer MOI 500 ergaben mittels FACS-Analyse eine 30%ige Effizienz. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit MOI 500 neu transfizierten Zellen ergaben eine 80%ige Effizienz. Bereits nach 48 h zeigte sich eine veränderte Zellmorphologie der hSMC der Neointima mit apoptotischem Aussehen.

Der immunologische Nachweis des p53 *knockdowns* und damit der Transduktion der hSMC war erfolgreich und es konnte kein p53 detektiert werden. Aufgrund der sterbenden Zellen war es jedoch nicht möglich weitere Versuche durchzuführen. ApoE- und p53-*Knockout*-Mäuse (Super-p53/apoE-KO) wurden bereits divers beschrieben sowie auch aus ihnen isolierte Zellen, die allerdings im Gegensatz zu den verwendeten hSMC der Neointima vital waren (Mayr et al., 2002, Sanz-Gonzalez et al., 2007).

Virustiter mit einer MOI von 100 sind zur Zeit im Test, um Effekte der adenoviralen Transduktion möglichst gering zu halten und vergleichende Untersuchungen mit Zellen der Media zu ermöglichen.

5.6 Unterschiedliche Patchmaterialien und Restenose

Um mögliche *in vitro* Mechanismen, die einer Patch-induzierten Restenose nach CEA zugrunde liegen, zu untersuchen, wurden verschiedene Typen von beschichteten und unbeschichteten Patches und ihre *in vitro* Effekte auf SMC betrachtet. Dazu wurden 5 verschiedene Patchtypen untersucht und verglichen.

Verwendete Patch-Typen:

- #1 Polyester-Velour, Kollagen-beschichtet
- #2 Polyester, Kollagen-beschichtet
- #3 Dacron, unbeschichtet
- #4 Polyester, Gelatin-imprägniert, Fluorpolymer-beschichtet
- #5 PTFE

MTT-Tests zeigten eine erhöhte Anzahl von SMC bei Verwendung eines beschichteten Polyesterpatches der Typen #1 und #2, wohingegen Patches aus anderen Materialien und unbeschichtete Patches keinen Effekt zeigten. Die zur Beschichtung verwendeten quervernetzenden Agentien Collagen / Gelatine und Formaldehyd / Glutaraldehyd wurden durch den Einsatz eines Gradienten bezüglich der Migration der Zellen und weiterer Proliferationstests mit Formaldehyd und Glutaraldehyd untersucht. Collagen erhöhte die Migration der SMC in Richtung des Gradienten. Bei Zusatz von Formaldehyd und Glutaraldehyd konnte eine gesteigerte Proliferation der SMC beobachtet werden.

Die Konzentrationskurve zeigte einen maximalen Effekt bei 10^{-8} M. Analysen des Patchtyps #2, der eine starke Reaktion hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der Zellen im Kontakt mit dem Patchstück zeigte, ergaben einen Formaldehydgehalt von $0,8 \mu\text{g}$ ($= 270 \text{ nmol}$) für ein Stück mit einer Größe von $6 \times 75 \text{ mm}$. Der Test mit Neointima, Intima und Media SMC verschiedener Spender zeigte unterschiedliche Reaktionen der Zellen. Einige Zellen reagierten mit einer gesteigerten Zellzahl auf den Stimulus, andere reagierten kaum, was auf mögliche unterschiedliche Effekte hinsichtlich des Einsatzes eines Patches an Patienten hindeutet.

Die Untersuchung der Patches zeigt den potentiellen Einfluss der quervernetzenden Agentien auf die Migration als auch Proliferation der Zellen, die sich im Einflussgebiet und damit nächster Nähe des Implantats befinden. Der Einsatz der vaskulären Prothese sollte im Hinblick auf das Restenoserisiko gründlich abgewogen werden, da ein möglicher negativer Effekt der Implantate nicht auszuschliessen ist.

5.7 Statin-beschichtete Stents zur Restenoseprävention

Der Einsatz von *drug eluting stents* (DES) hat neben seinen positiven Eigenschaften als lumenschaffendes Implantat auch negative Auswirkungen. Die mit Polymeren beschichteten DES weisen einen überschüssigen Wundheilungsprozeß auf, der als Nachteil die verzögerte Bildung neuer Gefäßinnenhaut, der Reendothelialisierung, nach sich zieht. Das Thromboserisiko steigt, eine zusätzliche Gabe von Plättchenaggregationshemmern ist sinnvoll. Die meistverwendeten Stents sind die zu Röhrchen geformten oder geschnittenen Drahtgeflechte, die aus superelastischen bioverträglichen Titan-Nickel-Legierungen bestehen und selbstexpandierend sind. Sie werden intrakoronar und peripher arteriell implantiert. Die Restenosierung der unter arteriellem Druck entstehenden Hyperplasie beträgt etwa 25 – 40 % (Valassis und Grigorios 2004). Das Beschichten der Stents verursacht eine lokal verteilte und hoch-konzentrierte Wirkdosis. Symmetrisch platziert im potentiellen Bereich der Neointima-Bildung, wird so die systemische Toxizität umgangen (Hwang et al., 2001). Die Wirkung ist von der Kombination der Droge, der Polymer-Beschichtung und der Kinetik der Freisetzung

abhängig. Der Wirkstoff wird in das Polymer oder das biodegradierbare Material eingebaut und freigesetzt oder durch einen Carrier gebunden und freigesetzt (Fattori und Piva, 2003).

Curcio et al. wiesen eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung der Polymerbeschichtung nach. Zum Beispiel erfolgt bei mit Methacrylat beschichteten Stents im Gegensatz zu unbeschichteten Stents (*bare metal stents*) ein Anstieg an apoptotischen Zellen, eine Caspase-3 Aktivierung und PARP Spaltung sowie ein Wachstumsstop der vaskulären SMC und eine verringerte Proliferation (Curcio et al., 2004). Das Trägerpolymer verursacht dabei eine inflammatorische Reaktion, welche meist den antiproliferativen Effekt der verwendeten Drogen zunichte macht (Murphy et al., 1991). Im Falle des Methylacrylats wird die Degradation des Methylacrylats als Ursache vermutet, welches die Entzündung hervorgerufen haben könnte (Virmani et al., 2002). Studien zur Beschichtung mit Sirolimus, einer Beschichtung mit Rapamycin aus einem Streptomyceten (Serruys et al., 2002, RAVEL-Studie; Schofer et al., 2003, SIRIUS-Studie) und Paclitaxel, dem Toxin aus der Eibe *Taxus brevifolia* (Hong et al., 2003, ASPECT-Studie; Ellis et al., 2007, TAXUS I-IV-Studien), wurden erfolgreich durchgeführt. Vergleiche von Paclitaxel mit und ohne Polymer-Carrier zeigten signifikante klinische Ergebnisse im positiven Sinne nur durch den Einsatz eines Carriers (Silber, 2003).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass der Erfolg eines DES nicht nur von der aufgetragenen Substanz, sondern auch von seinen Polymereigenschaften abhängig ist. Mit Hilfe von DES kann das Restenoserisiko kurzzeitig gesenkt werden; die resultierende Mortalität und mögliche Myokardinfarkte nach 3-5 Jahren weisen jedoch keinen Unterschied mehr zu den Resultaten nach dem Einsatz eines unbeschichteten Stents auf (Ma et al., 2008).

Die Restenoserate ist, neben dem Einfluss von unveränderlichen Faktoren wie familiärer Disposition und variablen Faktoren wie dem Lebensstil auch vom Einsatz eines unbeschichteten Stents oder DES und der zusätzlichen Medikation sowie der Länge der Läsion, dem Durchmesser als auch von zusätzlichen Krankheiten wie Diabetes mellitus abhängig.

Zu den neueren Methoden gehören ein nur abluminal Pharmaka absondernder Stent, bioabsorbierbare/biodegradierbare Stents aus Polymeren oder Magnesium (Biotronik), welche durch Gewebe ersetzt werden und aber auch Stents mit bereits integrierten endothelialen Progenitorzellen, die die Heilungsfunktion unterstützen (Macaya und Moreno, 2008).

Wichtig bleibt jedoch die Beachtung möglicher Arzneimittelinteraktionen oder Wirkspiegelverschiebungen, vor allem hinsichtlich möglicher lokaler Verwendung von proapoptotischen Substanzen im System.

Tierstudien zum antiproliferativen und proapoptotischen Einsatz der Statine, besonders in Hinblick auf die Neointimabildung, wurden bisher an Mäusen, Ratten und Kaninchen durchgeführt und nur einmal im Schwein, welches dem humanen System am ähnlichsten ist (Gelman et al., 1991; Scheller et al., 2003). Die Studie von Scheller et al. 2003 mit Atorvastatin-beschichteten Stents in Schweinen zeigte keine reduzierte Neointima-Bildung.

Für die Zukunft könnte die mögliche Regulation der Apoptose in diesen Zellen durch potentere Statine wie beispielsweise Cerivastatin erfolgen. Klinisch betrachtet, könnten diese Substanzen in DES eingesetzt werden und somit lokal anstatt systemisch wirksam werden (Jaschke et al., 2005).

6. Zusammenfassung

Die Restenose als Ergebnis einer neointimalen Hyperplasie stellt ein wichtiges klinisches Problem bei der invasiven Therapie der Atherosklerose dar. Verantwortlich sind u. A. aus der Media in die Intima migrierte SMC, die zum Aufbau einer sog. Neointima beitragen. Die vorliegende Arbeit zeigte Unterschiede bezüglich der SMC der Neointima und der Media auf, die sich auf Proliferation, Apoptose als auch Expression des Tumorsuppressorproteins p53 und dessen Aktivierung erstrecken. Es konnte eine deutlich sensitivere Reaktion von Zellen aus der Neointima in Bezug auf Apoptoseinduktion im Vergleich zu SMC der Media festgestellt werden. Pleiotrop wirkende Statine verursachten vor allem in hSMC eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation als auch eine Induktion der Apoptose.

Auf Proteinebene war keine Aktivierung des p53-Systems zu beobachten, was zu der Vermutung führte, dass Statine zwar proapoptotisch wirken, aber dieser Vorgang nicht über p53 reguliert wird. Durch die differenten Wege Apoptose auszulösen, könnten die Statine durchaus eine PARP-Spaltung und Apoptose verursachen, ohne über den p53-Signalpfad zu wirken. Das eingesetzte Anthracyclin-Antibiotikum Doxorubicin erwies sich als potenter Apoptose-Induktor, es verursachte sowohl starke Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion als auch eine deutliche Spaltung des Proteins PARP und eine Degradation des p53, was auf eine Regulation der Apoptose über das Tumorsuppressorprotein rückschliessen lässt.

Der Versuch, das Protein p53 mittels siRNA und shRNA temporär auszuschalten, führte zu einer erhöhten Letalität der SMC der Neointima, wodurch nachfolgende Versuche bezüglich der Auswirkung des inaktiven p53 auf Proliferation und Apoptose der Zellen hinfällig waren. Der letale *knockdown* von p53 in den hSMC der Neointima ist möglicherweise durch die Beteiligung von p53 an vitalen Signalwegen innerhalb der Zelle zu erklären. Das Vorhandensein des p53 scheint als Transkriptionsfaktor, zur Kontrolle des Zellzyklus und der DNA-Reparatur eine essentielle Rolle bei den SMC der Neointima zu spielen.

Für die Zukunft könnte die mögliche Regulation der Apoptose in diesen Zellen durch lokal eingebrachte, potentere Statine wie beispielsweise Cerivastatin versucht werden. Eine klinische Anwendung in DES wäre denkbar.

7. Literaturverzeichnis

- [No authors listed] Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet*. 1994 Nov 19;344(8934):1383-9.
- Aburahma AF, Stone PA, Elmore M, Flaherty SK, Armistead L, AbuRahma Z. Prospective randomized trial of ACUSEAL (Gore-Tex) vs Finesse (Hemashield) patching during carotid endarterectomy: long-term outcome. *J Vasc Surg*. 2008 Jul;48(1):99-103. Epub 2008 Apr 14.
- Antonawich FJ, Krajewski S, Reed JC, Davis JN. Bcl-x(l) Bax interaction after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998 Aug;18(8):882-6.
- Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):50-7.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng*. 2000 Mar 20;67(6):704-13.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8. Comment in: *J Hepatol*. 2003 Nov;39(5):883-5.
- Baetta R, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C, Paoletti R, Fumagalli R, Soma MR. Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacol Res*. 1997 Aug;36(2):115-21.
- Baghdasarian SB, Jneid H, Hoogwerf BJ. Association of dyslipidemia and effects of statins on nonmacrovascular diseases. *Clin Ther*. 2004 Mar;26(3):337-51.
- Bar J, Cohen-Noyman E, Geiger B, Oren M. Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *Oncogene*. 2004 Mar 18;23(12):2128-37.
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J*. 1993 Feb;12(2):461-8.
- Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)*. 1994 May;12(5):487-93.
- Bauriedel G, Höfling B. Mechanismus der Re-Stenosierung nach Angioplastie. *Medizin im Dialog, Sonderheft Kardiologie*; 1995; 08:6-13
- Beham A, Marin MC, Fernandez A, Herrmann J, Brisbay S, Tari AM, Lopez-Berestein G, Lozano G, Sarkiss M, McDonnell TJ. Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene*. 1997 Dec 4;15(23):2767-72.
- Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2521-7.
- Bhargava B, Karthikeyan G, Abizaid AS, Mehran R. New approaches to preventing restenosis. *BMJ*. 2003 Aug 2;327(7409):274-9.
- Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernández-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, Egido J. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis*. 2002 Mar;161(1):17-26.

- Bu DX, Erl W, de Martin R, Hansson GK, Yan ZQ. IKKbeta-dependent NF-kappaB pathway controls vascular inflammation and intimal hyperplasia. *FASEB J*. 2005 Aug;19(10):1293-5. Epub 2005 Jun 6.
- Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981 Apr;112(2):195-203.
- Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis*. 2002 Dec;23(12):2011-8.
- Carmeliet P, Collen D. Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney Int*. 1998 Jun;53(6):1519-49.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395-419.
- Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ. mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*. 1996 May;16(5):2445-52.
- Choi YH, Kim MJ, Lee SY, Lee YN, Chi GY, Eom HS, Kim ND, Choi BT. Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during beta-lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. *Int J Oncol*. 2002 Dec;21(6):1293-9.
- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994 Oct 7;79(1):13-21
- Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1993 Dec 15;28(12):35-43.
- Corsini A, Raiteri M, Soma M, Fumagalli R, Paoletti R. Simvastatin but not pravastatin inhibits the proliferation of rat aorta myocytes. *Pharmacol Res*. 1991 Feb;23(2):173-80.
- Counis MF, Torriglia A. DNases and apoptosis. *Biochem Cell Biol*. 2000;78(4):405-14.
- Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem*. 2001 Apr;77(1):220-8.
- Curcio A, Torella D, Cuda G, Coppola C, Faniello MC, Achille F, Russo VG, Chiariello M, Indolfi C. Effect of stent coating alone on in vitro vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Mar;286(3):H902-8. Epub 2003 Oct 30.
- Doggrell SA. Statins in the 21st century: end of the simple story? *Expert Opin Investig Drugs*. 2001 Sep;10(9):1755-66.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
- Elis A, Blickstein D, Manor Y, Lishner M. Association between alopecia and response to chemotherapy in patients with Hodgkin lymphoma. *Ther Drug Monit*. 2005 Jun;27(3):287-9.
- Ellis SG, Colombo A, Grube E, Popma J, Koglin J, Dawkins KD, Stone GW. Incidence, timing, and correlates of stent thrombosis with the polymeric paclitaxel drug-eluting stent: a TAXUS II, IV, V, and

- VI meta-analysis of 3,445 patients followed for up to 3 years. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Mar 13;49(10):1043-51. Epub 2007 Feb 26.
- Enos WF, Holmes RH, Beyer J. Coronary disease among United States soldiers killed in action in Korea; preliminary report. *J Am Med Assoc* 1953 Jul 18;152(12):1090-3
 - Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1999 Apr 2;84(6):668-77.
 - Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003 Aug;169(2):251-8.
 - Erl W, Weber C, Hansson GK. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu(2+) and Zn(2+). *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Jun;278(6):C1116-25.
 - Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1317-22.
 - Fabisiak JP, Kagan VE, Ritov VB, Johnson DE, Lazo JS. Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis. *Am J Physiol* 1997 Feb;272(2 Pt 1):C675-84
 - Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998 Feb 15;101(4):890-8
 - Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992 Dec 15;149(12):4029-35
 - Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):8945-51.
 - Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet*. 2003 Jan 18;361(9353):247-9.
 - Fichtl, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Urban & Fischer, 8. Auflage 2001; Kapitel 1.8; S. 95-110
 - Fields S, Jang SK. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*. 1990 Aug 31;249(4972):1046-9.
 - Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999 Dec 16;18(54):7719-30.
 - Gorina S, Pavletich NP. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*. 1996 Nov 8;274(5289):1001-5.
 - Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J*. 1999 Nov 15;18(22):6462-71.
 - Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1998;8(5):359-68.
 - Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, Andrade SE, Schech SD, La Grenade L, Gurwitz JH, Chan KA, Goodman MJ, Platt R. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA*. 2004 Dec 1;292(21):2585-90. Epub 2004 Nov 22. Comment in: *JAMA*. 2004 Dec 1;292(21):2647-50. *JAMA*. 2005 Mar 23;293(12):1448; author reply 1448-9.

- Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):477-86.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
- Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*. 2000 Jun;52(2):237-68.
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998 Sep 7;83(5):490-500
- Han Z, Bhalla K, Pantazis P, Hendrickson EA, Wyche JH. Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1381-9.
- Haupt Y, Barak Y, Oren M. Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J*. 1996 Apr 1;15(7):1596-606.
- Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 1988 Jul;107(1):307-19.
- Hengartner MO. Apoptosis and the shape of death. *Dev Genet*. 1997;21(4):245-8.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6. Comment in: *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):685-7.
- Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2091-3.
- Hidaka Y, Eda T, Yonemoto M, Kamei T. Inhibition of cultured vascular smooth muscle cell migration by simvastatin (MK-733). *Atherosclerosis*. 1992 Jul;95(1):87-94.
- Hillebrands JL, Klatter FA, Rozing J. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Mar 1;23(3):380-7. Epub 2003 Jan 30.
- Holmes DR Jr, Vlietstra RE, Smith HC, Vetrovec GW, Kent KM, Cowley MJ, Faxon DP, Gruentzig AR, Kelsey SF, Detre KM, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol*. 1984 Jun 15;53(12):77C-81C.
- Hong MK, Mintz GS, Lee CW, Song JM, Han KH, Kang DH, Song JK, Kim JJ, Weissman NJ, Fearnot NE, Park SW, Park SJ; ASian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial. Paclitaxel coating reduces in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the Asian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial (ASPECT). *Circulation*. 2003 Feb 4;107(4):517-20.
- Hu Y, Benedict MA, Ding L, Núñez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*. 1999 Jul 1;18(13):3586-95.
- Huss R. Isolation of primary & immortalized CD 34- hematopoietic & mesenchymal stem cells from various sources; *DStem Cells* 2000, 18: 1 – 9
- Hwang CW, Wu D, Edelman ER. Physiological transport forces govern drug distribution for stent-based delivery. *Circulation*. 2001 Jul 31;104(5):600-5.

- Igarashi M, Yamaguchi H, Hirata A, Tsuchiya H, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T. Mechanisms of inhibitory effects of cerivastatin on rat vascular smooth muscle cell growth. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002 Aug;40(2):277-87.
- Ikeda U, Shimada K. Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2001 Jun;1(1):51-8.
- Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, Leccia A, Cavuto L, Stingone AM, Chieffo A, Capozzolo C, Chiariello M. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Jan;35(1):214-21.
- Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, Kastrati A, Schömig A, Wessely R. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res*. 2005 Dec 1;68(3):483-92. Epub 2005 Aug 18.
- Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Schor NF, Kawai K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett*. 2000 Jul 14;477(1-2):1-7.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2001 Dec;11(12):526-34.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991 Jun 21;252(5013):1708-11.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-57
- Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*. 2001 Aug;8(8):739-58.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997 Feb 21;275(5303):1132-6. Comment in: *Science*. 1997 Feb 21;275(5303):1081-2.
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*. 1999 Sep 10;285(5434):1733-7.
- Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation*. 1998 Jul 21;98(3):224-33.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):299-303.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):331-42.
- Lam M, Dubyak G, Chen L, Nuñez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 5;91(14):6569-73.

- Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhata R, Brady JN. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):33048-53.
- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979 Mar 15;278(5701):261-3.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):15-6. Comment in: *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):486-7. Comment on: *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):80-3. *Nature*. 1992 Jul 2;358(6381):83-6.
- Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*. 1973 Aug;32(2):302-14.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.
- Li H, Bergeron L, Cryns V, Pasternack MS, Zhu H, Shi L, Greenberg A, Yuan J. Activation of caspase-2 in apoptosis. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21010-7.
- Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol*. 2002 Nov;86(1):5-18.
- Lin J, Tang H, Jin X, Jia G, Hsieh JT. p53 regulates Stat3 phosphorylation and DNA binding activity in human prostate cancer cells expressing constitutively active Stat3. *Oncogene*. 2002 May 2;21(19):3082-8.
- Lohrum MA, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol*. 2000 May;10(5):197-202.
- Löw I, Wieland T. The interaction of phalloidin. Some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry. *FEBS Lett*. 1974 Aug 30;44(3):340-3.
- Lowe HC, Oesterle SN, Khachigian LM. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 16;39(2):183-93.
- Luscher TF, Oemar BS, Yang Z, Noll G. Molecular and cellular mechanisms of arteriosclerosis and restenosis: possibilities of gene therapy. *Z Kardiol* 1996 Jul;85(7):495-508
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
- Ma HY, Zhou YJ, Dick RJ, Shi DM, Liu YY, Cheng WJ, Guo YH, Wang JL, Ge HL. Long-term outcome of patients of over 85 years old with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary stenting: a comparison of bare metal stent and drug eluting stent. *Chin Med J (Engl)*. 2008 May 20;121(10):887-91.
- Macaya C, Moreno R. Bioabsorbable drug-eluting stents: the future of coronary angioplasty? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008 Aug 5. [Epub ahead of print]
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. 1: *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):3-15. Comment in: *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):1-2. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):16-9.
- Malle E, Kostner GM. Effects of fish oils on lipid variables and platelet function indices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1993 Sep;49(3):645-63.
- Mann MJ, Dzau VJ. Molecular approaches for the treatment of atherosclerosis. *Cardiol Clin*. 2002 Nov;20(4):633-43.
- Mayr U, Mayr M, Li C, Wernig F, Dietrich H, Hu Y, Xu Q. Loss of p53 accelerates neointimal lesions of vein bypass grafts in mice. *Circ Res*. 2002 Feb 8;90(2):197-204.

- Mercado N, Boersma E, Wijns W, Gersh BJ, Morillo CA, de Valk V, van Es GA, Grobbee DE, Serruys PW. Clinical and quantitative coronary angiographic predictors of coronary restenosis: a comparative analysis from the balloon-to-stent era. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Sep;38(3):645-52.
- Midgley CA, Owens B, Briscoe CV, Thomas DB, Lane DP, Hall PA. Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J Cell Sci*. 1995 May;108 (Pt 5):1843-8.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1799-805.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):293-9.
- Moliterno DJ, Topol EJ. A direct comparison of tirofiban and abciximab during percutaneous coronary revascularization and stent placement: rationale and design of the TARGET study. *Am Heart J*. 2000 Nov;140(5):722-6.
- Moroi M, Izumida T, Morita T, Tatebe J, Ishii C, Imai T, Yagi S, Yamaguchi T, Katayama S. Effect of p53 deficiency on external vascular cuff-induced neointima formation. *Circ J*. 2003 Feb;67(2):149-53.
- Morris KV. RNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;320:211-24.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001 May;3(3):225-33.
- Müller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Krone W. [Mechanisms of plaque stabilization] *Herz*. 1999 Feb;24(1):26-31.
- Murphy JG, Schwartz RS, Huber KC, Holmes DR Jr. Polymeric stents: modern alchemy or the future? *J Invasive Cardiol*. 1991 May-Jun;3(3):144-8.
- Nahi H, Merup M, Lehmann S, Bengtzen S, Möllgård L, Selivanova G, Wiman KG, Paul C. PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells with p53 gene deletion. *Br J Haematol*. 2006 Jan;132(2):230-6.
- Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the heart. *Chest*. 1997 Nov 5;112(5):1358-62.
- Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 1988 Sep;12(3):616-23
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*. 2000 Sep 15;102(6):849-62.
- Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):189-92. Comment on: *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):329-39. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):341-51. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):353-64.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):609-19.

- Orlandi A, Ehrlich HP, Ropraz P, Spagnoli LG, Gabbiani G. Rat aortic smooth muscle cells isolated from different layers and at different times after endothelial denudation show distinct biological features in vitro. *Arterioscler Thromb*. 1994 Jun;14(6):982-9.
- Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*. 1999 Dec;147(2):253-61.
- Pasterkamp G, de Kleijn DP, Borst C. Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications. *Cardiovasc Res*. 2000 Mar;45(4):843-52.
- Pacher P, Szabó C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007 Fall;25(3):235-60.
- Perry ME, Levine AJ. Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Feb;3(1):50-4.
- Plendl J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol*. 2000 Oct;29(5):257-66.
- Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med*. 1998 Feb;4(2):222-7.
- Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool*. 1989 Aug;251(2):224-31.
- Proietti De Santis L, Balajee AS, Lorenti Garcia C, Pepe G, Worboys AM, Palitti F. Inhibition of p53, p21 and Bax by pifithrin-alpha does not affect UV induced apoptotic response in CS-B cells. *DNA Repair (Amst)*. 2003 Aug 12;2(8):891-900.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992 Apr 2;356(6368):397-400
- Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2000 Oct;17(10):927-38.
- Raiteri M, Arnaboldi L, McGeady P, Gelb MH, Verri D, Tagliabue C, Quarato P, Ferraboschi P, Santaniello E, Paoletti R, Fumagalli R, Corsini A. Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 Jun;281(3):1144-53
- Reed JC. Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer. *J Clin Invest*. 1996 Jun 1;97(11):2403-4. Comment on: *J Clin Invest*. 1996 Jun 1;97(11):2651-9.
- Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. 1997 Jun 19;387(6635):773-6.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):777-83.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 Jan 14;340(2):115-26. Comment in: *N Engl J Med* 1999 Jun 17;340(24):1928-9. *N Engl J Med* 1999 Jun 17;340(24):1928; author reply 1929. *N Engl J Med* 1999 Jun 17;340(24):1928; author reply 1929
- Sahni R, Maniet AR, Voci G, Banka VS. Prevention of restenosis by lovastatin after successful coronary angioplasty. *Am Heart J*. 1991 Jun;121(6 Pt 1):1600-8. Comment in: *Am Heart J*. 1992 Jun;123(6):1724-5.

- Salvesen GS. Serpins and programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 1997;425:177-83
- Sanz-González SM, Barquín L, García-Cao I, Roque M, González JM, Fuster JJ, Castells MT, Flores JM, Serrano M, Andrés V. Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007 Sep 1;75(4):803-12. Epub 2007 May 10.
- Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Kaneda Y, Yashiro H, Shirakawa I. The role of circulating precursors in vascular repair and lesion formation. *J Cell Mol Med.* 2005 Jul-Sep;9(3):557-68.
- Scheller B, Schmitt A, Böhm M, Nickenig G. Atorvastatin stent coating does not reduce neointimal proliferation after coronary stenting. *Z Kardiol.* 2003 Dec;92(12):1025-8.
- Schofer J, Schlüter M, Gershlick AH, Wijns W, Garcia E, Schampaert E, Breithardt G; E-SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS). *Lancet.* 2003 Oct 4;362(9390):1093-9.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998 Jun 15;254(3):439-59.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7834-8.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):593-602.
- Serruys PW, Degertekin M, Tanabe K, Abizaid A, Sousa JE, Colombo A, Guagliumi G, Wijns W, Lindeboom WK, Ligthart J, de Feyter PJ, Morice MC; RAVEL Study Group. Intravascular ultrasound findings in the multicenter, randomized, double-blind RAVEL (RAnomized study with the sirolimus-eluting VELOCITY balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery lesions) trial. *Circulation.* 2002 Aug 13;106(7):798-803.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997 Oct 31;91(3):325-34.
- Siegel-Axel DI. Cerivastatin: a cellular and molecular drug for the future? *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jan;60(1):144-64.
- Siess W, Roth P, Scherer B, Kurzmann I, Böhlig B, Weber PC. Platelet-membrane fatty acids, platelet aggregation, and thromboxane formation during a mackerel diet. *Lancet.* 1980 Mar 1;1(8166):441-4.
- Silber S. Paclitaxel-eluting stents: are they all equal? An analysis of six randomized controlled trials in de novo lesions of 3,319 patients. *J Interv Cardiol.* 2003 Dec;16(6):485-90.
- Sindermann JR, Fan L, Weigel KA, Troyer D, Muller JG, Schmidt A, March KL, Breithardt G. Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 2000 Jun;150(2):331-41
- Sindermann JR, Köbbert C, Skaletz-Rorowski A, Breithardt G, Plenz G, March KL. Vascular injury response in mice is dependent on genetic background. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Mar;290(3):H1307-10. Epub 2005 Oct 7.

- Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzini G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R. HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1993 Apr;13(4):571-8.
- Soussi T, Caron de Fromentel C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*. 1990 Jul;5(7):945-52.
- Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994 Jul 15;265(5170):391-4. Comment in: *Science*. 1994 Jul 15;265(5170):320.
- Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994 May;159(2):229-37
- Statistisches Bundesamt 2007, <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneSterbeziffer.psml>
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8359-62.
- Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):477-85.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1312-6
- Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*. 2000 Jan 21;466(1):6-10.
- Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 1996 Dec 6;271(49):31075-85
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):245-54.
- Veillard NR, Mach F. Statins: the new aspirin? *Cell Mol Life Sci*. 2002 Nov;59(11):1771-86.
- Virmani R, Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Montorfano M, Farb A, Kolodgie FD, Colombo A. Mechanism of late in-stent restenosis after implantation of a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system in humans. *Circulation*. 2002 Nov 19;106(21):2649-51.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):594-604.
- Wang T, Lee K, Rehman A, Daoud SS. PRIMA-1 induces apoptosis by inhibiting JNK signaling but promoting the activation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 5;352(1):203-12. Epub 2006 Nov 9.
- Wang W, Prince CZ, Hu X, Pollman MJ. HRT1 modulates vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Aug 29;308(3):596-601.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001 Nov 15;15(22):2922-33.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber PC. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 May;15(5):622-8.

- Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1997 Nov 1;30(5):1212-7. Comment in: *J Am Coll Cardiol* 1997 Nov 1;30(5):1218-9
- Williams GT. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol.* 1994 Dec;2(12):463-4.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7A):1126-32.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306
- Yan ZQ, Sirsjö A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Dec;19(12):2854-62.
- Yan ZQ, Sirsjö A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Dec;19(12):2854-62.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):285-91.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997 Feb 21;275(5303):1129-32. Comment in: *Science.* 1997 Feb 21;275(5303):1081-2.
- Yang X, Chang HY, Baltimore D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* 1998 Jan;1(2):319-25
- Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, Nakashima Y, Komori K, Sugimachi K, Sueishi K. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res.* 1998 Feb 9;82(2):147-56.

8. Anhang

Tab. 4: Statine

Name	Handels-name	Herkunft	Form	Dosierung / d	Plasma-spiegel	Aktivierung
Atorvastatin	Sortis [®]	vollsynthetisch	Na-Salz	10 – 80 mg	2,23 – 22,3 nM	CYP450 (3A4) Leber
Cerivastatin	Lipobay [®]	vollsynthetisch	Ca-Salz	0,1 – 0,4 mg	4,9 nM	CYP450 (2C9) Leber
Fluvastatin	Lescol [®]	vollsynthetisch	Na-Salz	20 – 80 mg	87 – 851 nM	CYP450 (2C9) Leber
Pitavastatin	Livato [®]	vollsynthetisch	Ca-Salz	2 mg		?
Rosuvastatin	Crestor [®]	vollsynthetisch	Ca-Salz	10 – 80 mg		CYP450 (3A4) Leber
Lovastatin	Mevinacor [®]	Pilzmetabolit aus <i>Aspergillus terreus</i> ; <i>Monascus ruber</i>	prodrug	10 - 40 mg	23 – 162 nM	CYP450 (3A4) Leber
Mevastatin	Compactin [®]	Pilzmetabolit aus <i>Penicillium citrinum</i>	prodrug	0,2 -100 mg TESTS		?
Pravastatin	Mevalotin [®]	Modifikation von Mevastatin, Pilzmetabolit aus <i>Nocardia autotrophica</i>	aktive Form	10 – 40 mg	14 – 358 nM	CYP450 (3A4) Leber
Simvastatin	Zocor [®] ,	synthetische Modifikation von Lovastatin	prodrug	5 – 80 mg	82 nM	CYP450 (3A4) Leber

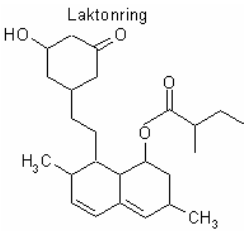
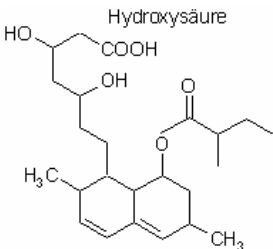
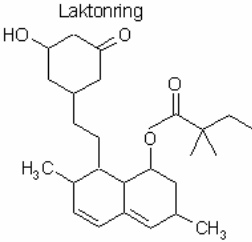
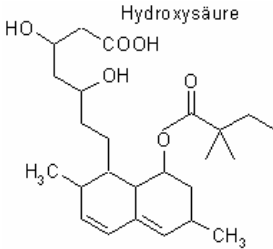
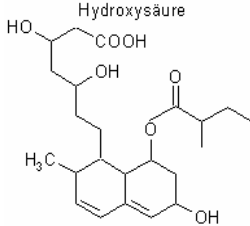
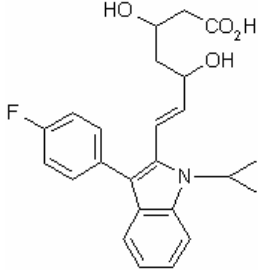
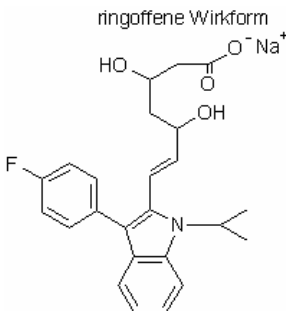
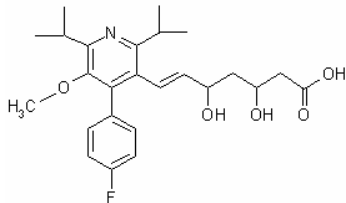
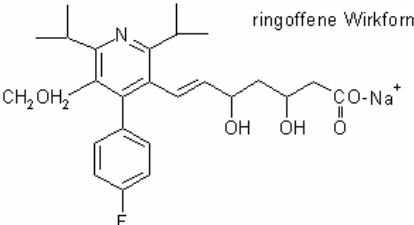
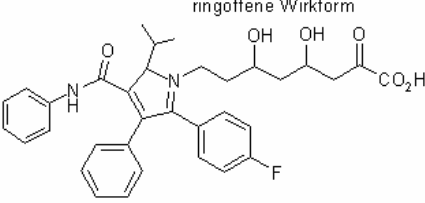
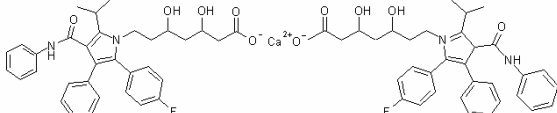
Tab. 5: Pharmakokinetische Daten (nach B. Fichtl aus Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Urban & Fischer, 8. Auflage 2001; Kapitel 1.8; S. 95-110)

Arzneistoff	BV (%)	V (l/kg)	PB (%)	CL (ml/min)	t 1/2	Q ₀	Anmerkungen
Atorvastatin	12	-	>95	-	14 (30 !!)	>0,98	-
Cerivastatin	60	0,3	>99	215	2	1	-
Fluvastatin	30	0,15	>98	650	1	1	-
Lovastatin	<5	-	>95	-	1,4	1,0	Prodrug, PB und t 1/2 für den Hauptmetaboliten
Mevastatin	?	?	?	?	?	?	?
Pravastatin	20	0,9/0,5	45	1000	2 (1 !!)	>0,8 !!	Prodrug, PB und t 1/2 für den Hauptmetaboliten
Simvastatin	<5	-	95	530 (V/F)	2 !!	1,0	Prodrug, First-pass-Metabolisierung zu aktiven Metaboliten.

Arzneistoff	BV (%)	V (l/kg)	PB (%)	CL (ml/min)	t 1/2	Q ₀	Anmerkungen
Doxorubicin	<10	20	75	1200	30	0,95 !!	

Legende: **BV (%)** absolute Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe (u.U. sehr abhängig von galenischer Zubereitung!); **V (l/kg)** Verteilungsvolumen; **PB (%)** Ausmass der Bindung an Plasmaproteine; **CL (ml/min)** totale Clearance; **t 1/2** dominierende Eliminationshalbwertszeit (nicht dominierende in Klammern [initiale oder terminale], HWZ von aktiven Metaboliten in Klammer mit !!); **Q₀** extrarenale Eliminationsfraktion (Bruchteil der resorbierten Dosis, der metabolisiert oder unverändert extrarenal ausgeschieden wird [Bildung aktiver Metabolite durch !! gekennzeichnet, bei bekannter t 1/2 und bekannter Q₀ (!)])

Tab. 6: Statine und ihre Strukturformeln

Substanz	Strukturformel	Wirkform
Lovastatin MW: 404.54		
Simvastatin MW: 418.57		
Pravastatin MW: 421.46		
Fluvastatin MW: 433.45		
Cerivastatin MW: 459.55		
Atorvastatin MW: 558.64		

9. Publikationen und Kongressbeiträge

Poster

- „Possible in vitro mechanism underlying patch-induced restenosis after carotid endarterectomy” (2. Juni 2006) bei der 12th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, an international meeting der Scandinavian Society for Atherosclerosis Research (SSAR) in Krogerup Højskole, Humlebaek, Copenhagen, Denmark
- „Possible in vitro mechanism underlying patch-induced restenosis after carotid endarterectomy” (Poster Session III, P30, 12. Oktober 2006) beim Annual Meeting 2006 der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V. am Deutschen Herzzentrum München an der Technischen Universität München

Vorträge

- „12th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference (May 31 – June 3, 2006 Humlebaek, Copenhagen, Denmark) and XIV International Symposium on Atherosclerosis (June 18-22, 2006 Rome, Italy)” im Seminar „Biochemische Grundlagen der Arteriosklerose“ (Ergänzungsveranstaltung 7MC009 (C) MeCuM und MeCuM LMU im SS 2006) des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- „Apoptosis in neointimal smooth muscle and vascular progenitor cells: a role of tumorsuppressor p53“ (13. Dezember 2006) im Graduiertenkolleg Curriculum " Vaskuläre Biologie in der Medizin" (Ergänzungsveranstaltung MeCuM und MeCuM LMU 7MC011 (C) im WS 2006/2007) des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- „Apoptose in Neointima und Progenitorzellen und die Rolle des Tumorsuppressors p53“ (24. Januar 2007) im Seminar „Biochemische Grundlagen der Arteriosklerose“ (Ergänzungsveranstaltung 7MC009 (C) MeCuM und MeCuM LMU im WS 2006/2007) des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- „Apoptose in Neointima und Progenitorzellen; die Rolle des Tumorsuppressors p53“ (08. Mai 2007) im Rahmen des pharmakologischen Seminars „Hot topics: Trends in der pharmakologischen und toxikologischen Forschung“ (Wahlpflichtveranstaltung 08223 im SS 07) des Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München
-

- „Apoptosis in neointimal smooth muscle cells: a role of tumorsuppressor p53“ (11. November 2007) IV. Symposium des DFG-Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ in Herrsching am Ammersee
- „Die Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 bei der Apoptoseregulation in glatten Gefäßmuskelzellen der Neointima (09. April 2008) im Seminar „Biochemische Grundlagen der Arteriosklerose“ (Ergänzungsveranstaltung 7MC002 (C) MeCuM und MeCuM LMU im WS 2006/2007) des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Publikationen und Kongressbeiträge

- „Possible in vitro mechanism underlying patch-induced restenosis after carotid endarterectomy“, W.Erl, A.Rode, R. Hegenloh, H. Stiegler, S. Seidel, P.C. Weber, R. Brandl, Editor: Agnes Görlach, Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology; J Vasc Res 2006; 43, 558, Abstracts
- Organisation des „Scientific Program“ und „Design & Layout“ des IV. Symposium des DFG-Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ in Herrsching am Ammersee (10. / 11. November 2007)

Teilnahme

- XIV International Symposium on Atherosclerosis, 18.-22. Juni 2006, Roma, Italien

10. Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber aussprechen, der mir die Möglichkeit gab, die Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Siess für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 348 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und für Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Betreut wurde die Arbeit durch Herrn. PD. Dr. rer. nat. W.Erl. Bei ihm, Herrn Professor Weber und Herrn Professor Siess möchte ich mich für die Überlassung des spannenden Themas und die kompetente wissenschaftliche Begleitung danken.

Herr PD. Dr. Erl hat mir die Freude an der Forschung vermittelt und mir neben einer stetigen Unterstützung innerhalb des Projektes die Möglichkeit zur Entwicklung und Verwirklichung eigener Ideen und Hypothesen gegeben. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, konstruktive Fehlerbetrachtung und Einbringung neuer Ideen waren Bestandteil der sehr guten Betreuung.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes möchte ich für die angenehme menschliche Atmosphäre, die ständige gegenseitige Hilfsbereitschaft, konstruktive Fehlerdiskussionen und das freundliche Arbeitsklima danken. Mein besonderer Dank gilt dabei Gabriele Berberich und Reinhard Brauner.

Mein Dank gilt auch PD Dr. P.J. Nelson (Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Poliklinik, Klinikum der LMU) für die Bereitstellung der L87-Zellen, dem Karolinska Institut (Stockholm) für die Bereitstellung der rSMC, Prof. R.Brandl (Gefäßchirurgie, Krankenhaus München-Schwabing) für die Bereitstellung der hSMC und Dr. C.Thirion (Sirion GmbH, Martinsried) für die Durchführung der Transduktion der hSMC.

Schließlich bedanke ich mich besonders herzlich für die Unterstützung meiner Eltern, meiner Oma und durch Stefan, ihre niemals endende Motivation und ihr festes Glauben an das Gelingen meiner Arbeit. Ohne sie und ihr Vertrauen in mich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch Familie Schmidt möchte ich für das oftmals spontane Catering und ihre ebenfalls unermüdliche Unterstützung danken.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbständig angefertigt habe.

Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Bisher habe ich noch an keiner Doktorprüfung teilgenommen.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Augsburg, den 01. 09. 2008

Ariane Rode

11. Persönliches ARIANE J. RODE

Dienstlich:

Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten, Pettenkoferstrasse 9, D-80336
München,
Tel.: 089 / 5160-4370
Email: ariane.ode@gmx.de

Persönliches

Geburtstag und -ort	08.01.1980 in Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung / Studium

2005 - 2008	Dissertation zum Thema „Die Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 bei der Apoptoseregulation glatter Gefäßmuskelzellen der Neointima“ bei PD Dr. W. Erl und Prof. Dr. P.C. Weber am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
2005 – 2008	Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
2005 – 2008	Stipendiatin des DFG-Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“
2001 - 2004	Hauptstudium der Biologie (Diplom) an der Universität Hannover in den Fächern Genetik, Biochemie, Pharmakologie / Toxikologie, Diplomprüfungen WS 2003
2004	Diplomarbeit (Pharmakologie / Toxikologie) WS 2004 „Interaktionen von pharmakologisch und toxikologisch relevanten Substanzen mit nukleären Rezeptoren“ bei PD Dr. Dr. A. Lampen und Prof. Dr. Dr. h.c. H. Nau in der Zentrumsabteilung für Lebensmitteltoxikologie an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
1999 - 2001	Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Universität Hannover, Vordiplom SS 2001
1992 - 1999	Georg-Büchner-Gymnasium Letter, Abitur
1990 - 1992	Orientierungsstufe Seelze
1986 - 1990	Grundschule Dedensen
